

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-515167

(P2003-515167A)

(43) 公表日 平成15年4月22日 (2003.4.22)

(51) Int.Cl. ⁷		識別記号	F I		テマコード* (参考)	
G 0 1 N	1/10		G 0 1 N	1/10	C	2 G 0 4 2
	1/00	1 0 1		1/00	1 0 1 G	2 G 0 5 2
	31/20			31/20		2 G 0 5 8
	35/08			35/08	A	
	37/00	1 0 1		37/00	1 0 1	
		審査請求 未請求		予備審査請求 有		(全 65 頁)
(21) 出願番号		特願2001-540363 (P2001-540363)		(71) 出願人		ザ ガヴァナーズ オブ ザ ユニヴァーシティー オブ アルバータ
(86) (22) 出願日		平成12年11月27日 (2000.11.27)				カナダ国 ティー6シー 2イー1 アルバータ州 エドモントン ストリート 8625-112 キャンパス タワー 222
(86) 翻訳文提出日		平成14年5月27日 (2002.5.27)		(72) 発明者		ハリソン, ディー ジェド
(86) 国際出願番号		P C T / C A 0 0 / 0 1 4 2 1				カナダ国 ティー6アール 1シー5 アルバータ州 エドモントン ルーニー クレセント 407
(87) 国際公開番号		W O 0 1 / 0 3 8 8 6 5		(74) 代理人		弁理士 柳田 征史 (外 1 名)
(87) 国際公開日		平成13年5月31日 (2001.5.31)				
(31) 優先権主張番号		2, 2 9 0, 7 3 1				
(32) 優先日		平成11年11月26日 (1999.11.26)				
(33) 優先権主張国		カナダ (C A)				

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ビーズベースの試薬を微小流体分析装置内に捕捉するための装置および方法

(57) 【要約】

本発明は、ビーズのような充填材料を小型化レベルで効率的に交換することのできるオンチップ充填反応床設計を提供する。本発明によれば、微小流体分析装置内に分析物を凝集させる方法であって、a) 充填材料を捕捉するのに適した捕捉区域を有する主要通路を提供し、b) 所定の組成の溶媒を有する溶液中に調製された試薬処理された充填材料のスラリーを提供し、c) 捕捉区域に充填し、充填材料の充填床を形成するように、捕捉区域に接続された流動通路を通して、捕捉区域中への充填材料の流動を誘発させ、d) 分析物を含有する試料を充填床に適して流動させる各工程を含み、試薬が、捕捉区域内に少なくともある程度の分析物が凝集するように作用することを特徴とする方法が提供される。本発明は、微小流体分析装置の機能を、オンチップ固相抽出 (S P E) およびオンチップキャピラリー電気クロマトグラフィー (C E C) を含む新規の用途まで拡張する。この設計はさらに、集積充填床免疫または酵素リアクタを含むように拡張できる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 微小流体分析装置内で試料を処理する方法であって、

- a) 充填材料を捕捉するのに適した捕捉区域を有する主要通路を提供し、
 - b) 所定の溶媒組成を有する溶液中に調製された試薬処理された充填材料のスラリーを提供し、
 - c) 前記捕捉区域を装填し、前記充填材料の充填床を形成するように、該捕捉区域に接続された流動通路を通して、該捕捉区域中への該充填材料の流動を生じさせ、
 - d) 分析物を含有する試料を前記充填床を通して流動させ、前記試薬が該試料を処理し、それによって、前記捕捉区域から排出される試料が、変更された分析物組成を有する、
- 各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】 e) 前記充填材料の凝集および前記充填床の安定化を行うように、前記溶媒の組成を調節する工程をさらに含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 工程b)が、多孔質ビーズから構成される充填材料を提供することを特徴とする請求項1または2記載の方法。

【請求項4】 前記多孔質ビーズが、約0.7から約10.0 μm までの範囲の直径を有するように選択されることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記多孔質ビーズが、約1.5から約4.0 μm までの範囲の直径を有するように選択されることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項6】 前記溶媒がアセトニトリルであり、工程e)が、前記充填床を安定化するようにその濃度レベルを約50%未満に調節する工程を含むことを特徴とする請求項4または5記載の方法。

【請求項7】 前記溶媒がアセトニトリルであり、工程e)が、前記充填床を安定化するようにその濃度レベルを約30%未満に調節する工程を含むことを特徴とする請求項4または5記載の方法。

【請求項8】 前記充填床を不安定化するように前記濃度レベルを50%より高く調節し、前記捕捉区域を未装填状態にするように、工程c)の前記流動を逆流

させる各工程を含むことを特徴とする請求項6または7記載の方法。

【請求項9】 前記捕捉区域を再度充填するように工程c)を繰り返し、前記充填床を再度安定化するように前記濃度レベルを再調節する各工程を含むことを特徴とする請求項8記載の方法。

【請求項10】 工程c)の前に、凝集を防ぐように、前記充填材料に中性界面活性剤を加え、

工程c)の後に、該中性界面活性剤を除去して、凝集を促進させる、各工程をさらに含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項11】 工程c)の後に、前記充填床を安定化するように、重合剤を前記流動通路中に導入し、該重合剤を重合させる、各工程をさらに含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項12】 工程d)が、流体力を加えて、前記充填材料の流動を生じさせる工程を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項13】 前記充填材料が少なくともいくつかの荷電された粒子を含み、工程d)が、電圧を加えて、該充填材料の流動を生じさせる工程を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項14】 前記充填材料が、磁場の影響を受けやすい粒子を少なくともいくつか含み、工程d)が、該充填材料の流動を生じさせる磁場を加える工程を含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項15】 前記充填材料の直接の見通し線進入を防ぎ、それによって、均一な充填を促進するように、前記流動通路と前記捕捉区域との間の接続点に屈曲構造体を提供する工程を含むことを特徴とする請求項1から14いずれか1項記載の方法。

【請求項16】 微小流体分析装置内にビーズベースの試薬を捕捉する方法であって、

a) ビーズベースの充填材料を捕捉するのに適した捕捉区域を有する主要通路を提供し、

b) 所定の溶媒組成を有する溶液中に調製された、試薬処理されたビーズのソリューションを提供し、

c) 前記捕捉区域に装填し、前記ピーズの充填床を形成するように、該捕捉区域に接続された流動通路を通る該捕捉区域中への前記ピーズの流動を生じさせ、

d) 前記充填材料の凝集および前記充填床の安定化を行うように、前記溶媒の組成を調節する、

各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項17】 微小流体分析装置において、

a) 上側表面を有する実質的に平面の基板、

b) 該上側表面に形成された少なくとも1つの主要通路であって、第1と第2の端部および使用されている流動の所定方向を有する主要通路、

c) 前記平らな基板の上方に配置され、前記通路を上から閉鎖するカバープレート、

d) 前記主要通路を横切って、該通路の前記第1と第2の端部の間に形成された第1の堰であって、使用時に、少なくともある程度の流動が、該第1の堰を越えて流れることのできる少なくとも1つの流動間隙を提供し、このとき、一般に該流動間隙よりも大きい構成粒子を有する充填材料を捕捉している第1の堰、を含むことを特徴とする微小流体分析装置。

【請求項18】 前記平面の基板の上側表面に形成された少なくとも1つの副通路をさらに含み、該副通路が、前記第1の堰より上流の位置において第1の端部で前記主要通路に、第2の端部でリザーバに接続されており、該副通路が前記主要通路よりも高い流れ抵抗を与えることを特徴とする請求項17記載の微小流体分析装置。

【請求項19】 前記副通路の接続された第1の端部より上流に位置する第2の堰をさらに含み、前記第1と第2の堰がそれらの間にチャンバを形成し、該第2の堰が、使用時に、少なくともある程度の流動が該第2の堰を越えて流れることのできる少なくとも1つの流動間隙を提供し、このとき、前記チャンバ内に前記充填材料を捕捉していることを特徴とする請求項18記載の微小流体分析装置。

【請求項20】 前記主要通路への各々の副通路の接続部に、一方の側に曲げられた屈曲構造体が設けられ、それによって、使用時に、充填材料が前記チャ

ンパ中に吹き付けられ、均一な充填を促進させることを特徴とする請求項19記載の微小流体分析装置。

【請求項21】 前記屈曲構造体が、少なくともある程度、前記副通路から前記チャンパ中への充填材料の直接の見通し線進入を妨害し、該屈曲構造体の一方の側にチャンパ口部を形成することを特徴とする請求項20記載の微小流体分析装置。

【請求項22】 前記流動間隙が、前記カバープレートと前記堰の頂部との間にほぼ均一な間隙を含むことを特徴とする請求項17から19いずれか1項記載の微小流体分析装置。

【請求項23】 前記流動間隙が、前記堰内の複数の実質的に垂直な間隙を含むことを特徴とする請求項17から19いずれか1項記載の微小流体分析装置。

【請求項24】 前記装置が1つの微小流体チップ上に完全に形成されていることを特徴とする請求項17から23いずれか1項記載の微小流体分析装置。

【請求項25】 請求項18記載の微小流体分析装置内に充填反応床を形成する方法において、非導電性基板を提供し、前記主要通路の第2の端部および充填材料を含有する前記リザーバに比較的高い電圧を加え、前記主要通路の第1の端部に比較的低い電圧を加えることにより界面動電流を生じさせ、それによって、充填材料が該リザーバから該主要通路中に流動し、前記第1の堰に対して捕捉される各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項26】 前記リザーバに比較的低い電圧を加えながら、前記主要通路の第1と第2の端部に比較的高い電圧を加えることにより、充填材料が該主要通路から除去されることを特徴とする請求項25記載の方法。

【請求項27】 請求項18記載の微小流体分析装置内に充填反応床を形成する方法において、前記主要通路の第2の端部および充填材料を含有する前記リザーバに比較的高い圧力を加え、該主要通路の第1の端部に比較的低い圧力を加えることにより圧力駆動流れを生じさせ、したがって、充填材料が、該リザーバから該主要通路中に流動し、前記第1の堰に対して捕捉される工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項28】 前記リザーバに比較的低い圧力を加えながら、前記主要通路の第1と第2の端部に比較的高い圧力を加えることにより、充填材料が該主要通路から除去されることを特徴とする請求項27記載の方法。

【請求項29】 請求項3記載の微小流体分析装置内のチャンバを充填する方法において、非導電性基板を提供し、充填材料を含有する前記リザーバに比較的高い電圧を加え、前記主要通路の第1と第2の端部に比較的低い電圧を加えることにより界面動電流を生じさせ、それによって、充填材料が該リザーバから該チャンバ中に流動し、前記第1と第2の堰により捕捉される各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項30】 充填材料が、前記界面動電流を逆にすることにより前記チャンバから除去されることを特徴とする請求項29記載の方法。

【請求項31】 請求項3記載の微小流体分析装置内のチャンバを充填する方法において、充填材料を含有する前記リザーバに比較的高い圧力を加え、第1と第2の前記主要リザーバに比較的低い圧力を加えることにより圧力駆動流れを生じさせ、それによって、充填材料が、該充填材料リザーバから前記チャンバ中に流動し、前記第1と第2の堰により捕捉される工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項32】 充填材料が、前記圧力駆動流れを逆にすることにより前記チャンバから除去されることを特徴とする請求項31記載の方法。

【請求項33】 請求項3記載の微小流体分析装置内のチャンバを充填する方法において、磁性充填材料を提供し、前記チャンバ内に磁力を提供することにより、磁気駆動流れを生じさせ、それによって、前記充填材料が該チャンバに進入し、前記第1と第2の堰により捕捉される工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項34】 充填材料が、前記チャンバ内の前記磁力を逆にすることにより、該チャンバから除去されてもよいことを特徴とする請求項33記載の方法。

【請求項35】 前記充填材料が多孔質ビーズから構成されることを特徴とする請求項25から34いずれか1項記載の方法。

【請求項36】 前記ビーズがほぼ球状であることを特徴とする請求項35記載の方法。

【請求項37】 前記ビーズが最初に緩衝液中に懸濁されていることを特徴とする請求項36記載の方法。

【請求項38】 前記緩衝液が、水と混和性の有機溶媒であることを特徴とする請求項37記載の方法。

【請求項39】 前記有機溶媒が、50%までの濃度レベルのアセトニトリルであることを特徴とする請求項38記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、広く、微小流体分析装置に関し、より詳しくは、小型化レベルで液相分析を行うためのマイクロ全分析装置（ μ -TAS）に関する。

【0002】

発明の背景

マイクロ全分析装置（ μ -TAS）の分野における最近の進歩により、1つのマイクロチップで小型化レベルで化学反応、分離および検出を行う装置がもたらされた[例えば、Harrison, D. J.; Fluri, K.; Seiler, K.; Fan, Z.; Effenhauser, C. S.; and Manz, A., Science 1993, 261, 895-897. Harrison, D. J.; and van den Berg, E.; Eds., Micro Total Analysis Systems '98, Proceedings of the μ -TAS '98 Workshop (Kluwer:Dordrecht, 1998). Coyler, C. L.; Tang, T.; Chiem, N.; and Harrison, D. J., Electrophoresis 1997, 18, 1733-1741参照]。

【0003】

殆どの従来技術の微小流体デバイスは、従来の開放管流動設計および溶液相試薬に基づくものである。これらのデバイスの機能性は増大し続けているが、これらの従来技術において現在欠けている重要な特徴の1つは、固定化試薬または固定相を有する充填材料を導入するための、オンチップ充填反応床を効果的に組み込む能力である。ある従来技術の設計において充填反応床を用いる試みがいくつか行われたが、今までのところ、充填材料（微細ビーズのような）を複雑な微小流体マニホールドの部分に充填するのが難しいために、微小流体デバイス内にこれらの試薬供給ビヒクルを効果的に利用することが妨げられていた（充填の難しさは、この分野の専門家によりよく認識されている。例えば、Ericson, C.; Holm, J.; Ericson, T.; and Hjerten, S., Analytical Chemistry参照）。

【0004】

ある従来技術の例において、ビーズ捕捉フリットを有する充填床クロマトグラフフィーデバースが、シリコン基板内に製造された [Oevirk, G., Verpoorte, E., Manz, A., Grasserbauer, M., and Widmer, H. M. Analytical Methods and Instru-

ntation 1995, 2, 74-82]。しかしながら、この従来技術の設計における充填材料は、容易に充填したり、交換したりできず、したがって、その実用性は限られていた。

【0005】

何人かの著者が、従来のキャピラリー内に充填材料を保持するためのフリットを再現できるように製造することに関連する困難を記載してきた [Boughtflower, R. J.; Underwood, T.; Paterson, C. J. *Chromatographia* 1995, 40, 329-335. Van den Bosch, S. E.; Heemstra, S.; Kraak, J. C.; Poppe, H. J. *Chromatogr. A* 1996, 755, 165-177. Colon, L. A.; Reynolds, K. J.; Alicea-Maldonado, R.; Fermier, A. M. *Electrophoresis* 1997, 18, 2162-2174. Majors, R. E. *LC-GC* 1998, 16, 96-110]。従来の装置に用いられたフリットは、時間と労力のかかる方法を用いて調製されるものであり、最も一般的に用いられていた方法は、水性ケイ酸ナトリウムにより湿らされた、純粋なシリカゲルの使用を含む。フリットは、最初に、シリカおよび水性ケイ酸ナトリウムから製造されたペースト中にキャピラリー端部を叩いて入れることにより製造される。次いで、形成されたシリカの栓を加熱して、フリットを製造する。現在の構成方法は、使用できるフリットを高い歩留まりで製造していない。

【0006】

さらに、従来技術の構成方法により製造されたフリットを用いると、望ましくない気泡が形成されることが多い [Altria, K. D.; Smith, N. W.; and Turnbull, C. H., *Chromatographia*, 46 (1997) 664. Majors, R. E., *LC-GC*, 16 (1998) 96]。気泡により、カラム内に不連続が生じ、溶液の流動が妨げられ、最終的に、分離が妨げられる。これらの気泡は、ビーズ捕捉フリットから開放キャピラリー中に移動することにより生じる電気浸透流 (EOF) 速度の変化から生じると考えられている。より高い電圧で増大することが観察されている、気泡の形成により、キャピラリーを横切るように引加できる電圧の量が制限され、それによって、カラムの長さ、分離効率、および分析速度が制限されてしまう。

【0007】

従来技術の制限を克服した、機能的なオンチップ充填反応床設計を開発するこ

とにより、微小流体ツールボックスの範囲が著しく向上し、そのようなデバイスの用途数が増えるであろう。

【0008】

発明の要約

一般に、本発明は、小型化レベルで充填材料（例えば、ビーズ）を効果的に交換できる、1つ以上の堰構造体を用いたオンチップ床設計を提供する。本発明は、微小流体分析装置の機能を新規の用途に拡張する。例えば、本発明により形成された充填反応床は、以下詳細に説明するように、オンチップ固相抽出（SPE）およびオンチップキャピラリー電気クロマトグラフィー（CEC）を可能にする。この設計はさらに、例えば、集積充填床免疫または酵素リアクタを含むように拡張できる。

【0009】

第1の態様において、本発明は、微小流体分析装置内で試料を処理する方法であって、

- a) 充填材料を捕捉するのに適した捕捉区域を有する主要通路を提供し、
 - b) 所定の溶媒組成を有する溶液中に調製された、試薬処理された充填材料のスラリーを提供し、
 - c) 捕捉区域に装填し、充填材料の充填床を形成するように、捕捉区域に接続された流動通路を通して、捕捉区域中への充填材料の流動を誘発させ、
 - d) 分析物を含有する試料を充填床に通して流動させ、それによって、捕捉区域を出る試料が、変更された分析物組成を有するようになる、
- 各工程を含む方法を提供する。

【0010】

ある実施の形態において、本発明はさらに、

- e) 充填材料の凝集および充填床の安定化を行うように、溶媒の組成を調節する、
- 工程を含む。

【0011】

別の実施の形態において、工程b)が、多孔質ビーズを含む充填材料を提供する

工程を含む。

【0012】

別の実施の形態において、前記多孔質ビーズは、約0.7から約10.0 μm までの範囲の直径を有するように選択される。

【0013】

さらに別の実施の形態において、前記多孔質ビーズは、約1.5から約4.0 μm までの範囲の直径を有するように選択される。

【0014】

別の実施の形態において、前記溶媒がアセトニトリルであり、工程e)が、充填床を安定化させるために、濃度レベルを約50%未満に調節する工程を含む。

【0015】

別の実施の形態において、前記溶媒がアセトニトリルであり、工程e)が、充填床を安定化させるために、濃度レベルを約30%未満に調節する工程を含む。

【0016】

別の実施の形態において、前記方法はさらに、充填床を不安定にさせるために、濃度レベルを50%より高く調節し、前記充填区域を未装填状態にするように、工程c)において流動を逆流させる各工程を含む。

【0017】

別の実施の形態において、前記方法はさらに、前記充填区域に再装填するように、工程c)を繰り返し、充填床を再度安定化するために、濃度レベルを再調節する各工程を含む。

【0018】

さらに別の実施の形態において、前記方法はさらに、
工程c)の前に、凝集を防ぐように、前記充填材料に中性界面活性剤を加え、
工程c)の後に、凝集を促進させるように、この中性界面活性剤を除去する各工程を含む。

【0019】

別の実施の形態において、前記方法はさらに、
工程c)の後に、充填床を安定化するように、重合剤を流動通路に導入し、この

重合剤を重合させる各工程を含む。

【0020】

さらに別の実施の形態において、工程d)は、前記充填材料の流動を誘発する流体力を加える工程を含む。

【0021】

別の実施の形態において、前記充填材料は少なくともいくつかの荷電粒子を含み、工程d)が、前記充填材料の流動を誘発する電場を加える工程を含む。

【0022】

別の実施の形態において、前記充填材料は、磁場の影響を受けやすい粒子を少なくともいくつか含み、工程d)が、前記充填材料の流動を誘発する磁場を加える工程を含む。

【0023】

別の実施の形態において、前記方法はさらに、前記充填材料の直接の見通し線(line-of-sight)進入を防ぎ、それによって、均一な充填を促進するように、前記流動通路と前記捕捉区域との間に接続点に屈曲構造体を提供する工程を含む。

【0024】

別の態様において、本発明は、微小流体分析装置内にビーズベースの試薬を捕捉する方法であって、

- a) ビーズベースの充填材料を捕捉するのに適した捕捉区域を有する主要通路を提供し、
 - b) 所定の溶媒組成を有する溶液中に調製された、試薬処理されたビーズのスラリーを提供し、
 - c) 前記捕捉区域に装填し、前記ビーズの充填床を形成するように、前記捕捉区域に接続された流動通路を通して、充填区域中へのビーズの流動を誘発させ、
 - d) 前記充填材料の凝集および充填床の安定化を行うように、前記溶媒の組成を調節する、
- 各工程を含む方法を提供する。

【0025】

さらなる態様において、本発明は、微小流体分析装置において、

- a) 上側表面を有する実質的に平面の基板、
- b) この上側表面に形成された少なくとも1つの主要通路であって、第1と第2の端部および使用される所定の流動方向を有する主要通路、
- c) 前記平面の基板上に配置されたカバープレートであって、その上から前記通路を閉鎖するカバープレート、
- d) 前記主要通路を横切り、該通路の第1と第2の端部の間に形成された第1の堰であって、流動間隙よりもほぼ大きい成分粒子を有する充填材料を捕捉しながら、使用中に、少なくともいくつかの流動を第1の堰を通過して流動させる少なくとも1つの流動間隙を提供する堰、を含む装置を提供する。

【0026】

ある実施の形態において、前記装置はさらに、前記平面の基板の上側表面中に形成された少なくとも1つの副通路を含み、この副通路が、第1の端部で、前記第1の堰より上流の位置で前記主要通路に、第2の端部で、リザーバに接続され、この副通路が前記主要通路よりも高い流動抵抗を与える。

【0027】

別の実施の形態において、前記装置はさらに、前記副通路の接続された第1の端部より上流に位置する第2の堰を含み、第1と第2の堰がそれらの間にチャンバを形成し、この第2の堰が、チャンバ内に前記充填材料を捕捉しながら、使用中に、少なくともある程度の流動を第2の堰を通過するように流動させる少なくとも1つの流動間隙を提供する。

【0028】

別の実施の形態において、前記主要通路への各々副通路の接続部には、1つの側部に曲げられた湾曲構造体が設けられ、それによって、使用中に、充填材料が前記チャンバ中に吹き付けられて、均一な充填が促進される。

【0029】

別の実施の形態において、前記湾曲構造体が、前記副通路から前記チャンバへの充填材料の直接の見通し線進入を少なくともある程度妨害し、湾曲構造体の一方の側に対してチャンバ口部を形成する。

【0030】

別の実施の形態において、前記流動間隙が、前記カバープレートと前記堰の頂部との間にほぼ均一な間隙を含む。

【0031】

さらに別の実施の形態において、前記流動間隙は、前記堰内の複数の実質的に垂直な間隙を含む。

【0032】

別の実施の形態において、前記装置は、1つの微小流動チップ上に完全に形成される。

【0033】

別の実施の形態において、本発明は、非導電性基板を提供し、主要通路の第2の端部および充填材料を含有するリザーバに、比較的高い電圧を加え、主要通路の第1の端部に比較的低い電圧を加えることにより界面動電流動を行わせる各工程を含み、したがって、充填材料がリザーバから主要通路中に流動し、第1の堰で捕捉される方法を提供する。

【0034】

ある実施の形態において、前記充填材料は、前記リザーバに比較的低い電圧を加えながら、前記主要通路の第1と第2の端部に比較的高い電圧を加えることにより、主要通路から除去される。

【0035】

別の態様において、本発明は、主要通路の第2の端部および充填材料を含有するリザーバに比較的高い圧力を加え、主要通路の第1の端部に比較的低い圧力を加えることにより、圧力駆動流れを生じさせる各工程を含み、したがって、充填材料がリザーバから主要通路中に流動し、第1の堰により捕捉される方法を提供する。

【0036】

ある実施の形態において、充填材料は、前記リザーバに比較的低い圧力を加えながら、前記主要通路の第1と第2の端部に比較的高い圧力を加えることにより、主要通路から除去される。

【0037】

別の実施の形態において、前記方法は、本発明は、非導電性基板を提供し、充填材料を含有するリザーバに比較的高い電圧を加え、主要通路の第1と第2の端部に比較的低い電圧を加えることにより界面動電流れを生じさせる各工程を含み、したがって、充填材料がリザーバからチャンバ中に流動し、第1と第2の堰で捕捉される方法を提供する。

【0038】

別の実施の形態において、充填材料は、前記界面動電流動を逆流させることによりチャンバから除去される。

【0039】

別の態様において、本発明は、微小流体分析装置内のチャンバを充填する方法であって、充填材料を含有するリザーバに比較的高い圧力を加え、第1と第2の主要リザーバに比較的低い圧力を加えることにより、圧力駆動流れを生じさせる工程を含み、それによって、充填材料が、充填材料リザーバから、チャンバ中に流動し、第1と第2の堰により捕捉される方法を提供する。

【0040】

別の実施の形態において、充填材料は、圧力駆動流れを逆流させることにより、チャンバから除去されてもよい。

【0041】

別の実施の形態において、前記方法は、磁性を帯びた充填材料を提供し、チャンバ内に磁力を加えることにより磁気駆動流れを生じさせる工程を含み、それによって、充填材料がチャンバ内に進入し、第1と第2の堰により捕捉される。

【0042】

別の実施の形態において、充填材料は、チャンバ内の磁力を逆にするにより、チャンバから除去されてもよい。

【0043】

上述した実施の形態のいずれにおいても、充填材料は、多孔質ビーズから構成されてもよい。

【0044】

別の実施の形態において、前記ピーズは、ほぼ回転楕円体であってもよい。

【0045】

別の実施の形態において、前記ピーズは、最初に緩衝液中に懸濁されている。

【0046】

別の実施の形態において、前記緩衝液は、水混和性有機溶媒である。

【0047】

別の実施の形態において、前記有機溶媒は、50%までの濃度レベルを有するアセトニトリルである。

【0048】

本発明をより理解するために、例として、本発明の好ましい実施の形態を示す、添付の図面を参照する。

【0049】

発明の詳細な説明

先に説明したように、本発明は、微小流体分析装置の用途の数を著しく増やす機能的オンチップ充填反応床を提供するために、オンチップの充填材料（ピーズのような）を捕捉し、捕捉区域を効果的に充填し、取り出せる都合のよい装置および方法を提供するように設計されている。

【0050】

本発明により促進されるそのような拡張された用途の1つは、固相抽出（SPE）によるオンチップ試料の予備濃縮である。微小流体分析において、SPEは、検出限界の問題を克服すること、または潜在的な干渉を除去することを要求されることが多い。これまで、マイクロチップ内の予備濃縮は、「等電点電気泳動法」を使用した試料スタッキングにより行われてきた [Jacobson, S. C. and Ramsey, M. Electrophoresis 1995, 16, 481-486]。都合よくは、試料スタッキングとは異なり、SPEは、特定の分析物に関して選択性に作製でき、緩衝液濃度の精密な制御を必要としない。SPEに関して、予備濃縮の量は予備濃縮時間により制限され、このために、試料スタッキングよりも融通性がある。分析物のSPEは、分析物の予備濃縮に関してだけでなく、他の不純物の除去または溶媒条件の変更に関しても、有益となる。SPEの微小流体デバイスとの組合せが行われ

てきたが [Figeys, D. and Aebersold, R. Anal. Chem. 1998, 70, 3721-3727]、これらの従来技術のデバイスにおけるSPE部材は、チップの外部のキャピラリーまたは同様なカートリッジ内に作製され、したがって、より複雑かつより高価な装置となっていた。本発明は、オンチップSPE部材を促進することにより、この従来技術の制限を克服するように設計されている。

【0051】

本発明により実現されたように、集積オンチップSPE部材は、製造が非常に容易であり、チップに結合する死空間が小さい必要がなく、従来技術において必要とされたオフチップ操作から生じる試料の取扱い損失や汚染問題が除かれる。本発明により促進される、チップ上へのSPEのごく普通の組込みにより、オンチップ検出限界に関する問題が減少し、集積できる試料の調製段階の範囲が改善されると期待される。

【0052】

本発明により促進される拡張された別の用途は、オンチップキャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) である。CECは、液体クロマトグラフィーおよびキャピラリー電気泳動の両方の分離能を組み合わせたという事実のために、最近著しい注目を浴びるようになってきた。これまで、デバイス内にクロマトグラフィー材料を充填することに関連する難点は、従来技術の開放通路法に行われてきた以前のクロマトグラフィーに関する労力に最も集中していた [Manz, A., Miyahara, Y. Miura, J., Watanabe, Y. Miyagi and H. Sato, K., Sens. Actuators 1990, B1, 249-255; Jacobson, S. C., Hergenroder, R. Koutny, L. B. and Ramsey, J. M. Anal. Chem. 1994, 66, 2369-2373; Kutter, J. P., Jacobson, S. C., Matsubara, N. and Ramsey, J. M. Anal. Chem. 1998, 70, 3291-3297; He, B. Tait, N. and Regnier, F. Anal. Chem. 1998, 70, 3790-3797]。従来技術において、2 μ m以下の通路幅を有する開放通路法のデバイスは、開放カラム中の移動相の移動を改善する必要があり、閉塞および検出のための短い路長のような他の事項を実際に検討する必要が生じた。また、再現性およびそのような構造体における固定相の費用に関する問題もあった。

【0053】

本発明者により実現されたように、本発明によるオンチップ充填床クロマトグ

ラフィーには、低移動相質量移動を提供する利点があり、様々な固定相が利用できるようになった。この場合、オフチップで調製された固定相を使用すると、チップを被覆する必要がなくなり、固定相の調製を最適化できるという利点を得られる。

【0054】

本発明により促進される拡張されたさらに別の用途は、オンチップのビーズに基づいた免疫測定法および酵素に基づく測定法を提供することにある。これらの用途が以下にさらに説明される。

【0055】

実施例

実施例により本発明を説明するために、本発明者は、ここに記載する一連の実験を行った。

【0056】

チップの設計

図1Aおよび1Bは、これらの実験に用いられた微小流体デバイス10を示している。デバイス10は、基板8の頂面に形成された主要通路11を含み、主要通路11は、これも基板8に形成されたチャンパ4により仕切られている。チャンパ4により仕切られた主要通路11の2つの分岐は、さらに主要リザーバ1および2と称される。チャンパ4は、狭い副通路5により充填材料リザーバ3に接続されている。充填材料リザーバおよび狭い副通路5もまた、基板8に形成されている。図1Bは、走査電子顕微鏡（マサチューセッツ州、ビーボディーのJeol X-Vision JSM6301FXV）により得られたチャンパ4の拡大画像を示している。チャンパ4は、主要通路11の比較的狭い部分に、主要通路11を横切って形成された2つの堰6, 7を提供することにより形成されている（図1A）。図1Bから分かるように、堰6, 7は、主要通路11の深さほどは高くなく、したがって、以下に説明するように、ある程度の流体が6, 7を越えて流れることができる。このデバイス10は、公知の化学エッチング法を用いて、Alberta Microelectronic Corporation（アルバータ州、エドモントン）によりコーニング0211ガラスに作製された [Fann, Z. H.; Harrison, D. J. Anal. Chem. 1994, 66, 177-184]。この基板材料は非導電性

であるが、界面動電力以外が用いられる場合（以下に詳述するように）、基板材料は、半導体または導体であってもよいことに留意されたい。デバイス10を形成するために、2つのフォトリソが必要であった：第1のフォトリソを用いて、堰6、7の頂部を約 $1\mu\text{m}$ の深さまでエッチングした；第2のフォトリソを用いて、通路5、11を約 $10\mu\text{m}$ の深さまでエッチングした。

【0057】

図2Aは、通路11（主要リザーバ1、2）の深さほど高くない堰6、7の断面図を示しており、したがって、基板の頂部に配置され、それによって、チャンパ4、通路5、11およびリザーバ1、2、3を閉じているカバープレート9（図1Aにも図1Bにも示されていない）と堰6、7の頂部との間に小さな流動間隙14、15が設けられる。図2Aに示されているように、ビーズ12は、一般に、流動間隙14、15よりも大きく、したがって、チャンパ4から逃れられない。

【0058】

図2Bおよび2Cは、堰6' がより小さい流動インピーダンスを与えるように、実質的に垂直V字型刻み目6'' が設けられている、堰6' の代わりの実施形態の、それぞれ、側面図および端面図を示している。垂直V字型刻み目6'' は、ビーズがそれらを通して流動できないほど十分に狭いべきである（すなわち、最小のビーズの直径よりも少なくとも約10%小さいべきである）。

【0059】

溶液および試薬

これらの実験に様々な溶液および試薬を用いた。使用前に、アセトニトリル（オンタリオ州、トロントのBDH社）を、 $0.45\mu\text{m}$ のナイロン-6、6フィルタ（イリノイ州、ディアフィールドのAltech社）に通して濾過した。そうでなければ、アセトニトリルを受け取ったまま用い、電解質は加えなかった。また、超純水（オンタリオ州、ミシソーガのMillipore Canada社）中に、50mMのリン酸カリウム（pH7.0）および酢酸アンモニウム（pH8.5）の緩衝液を調製した。アセトニトリルおよび緩衝液の1:1（v/v）混合物を調製した。0.10mMの4,4'-ジフルオロ1,3,5,7,8-ペンタメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン、BODIPY493/503（オレゴン州、ユーージン

のMolecular Probes社)の原液を、HPLC級のメタノール(ニュージャージー州、フェアローンのFisher社)中に調製した。フルオレセイン二ナトリウム塩(シグマ社)の1mMの原液をリン酸緩衝液中に調製した。次いで、両方の原液を、50mMのリン酸緩衝液および50mMの酢酸アンモニウム緩衝液中で希釈して、1.0mMの溶液を得て、次いで、これらを1.0nMまで希釈した。この1.0nM溶液は、予備濃縮および電気クロマトグラフィーのための試料として用いた。使用前に、全ての水溶液(緩衝液および試料)を、酢酸セルロースシリンジフィルタ(0.2 μ mの細孔サイズ)(ニューヨーク州、ロチェスターのNalgene社)に通して濾過した。

【0060】

充填材料

これらの実験に用いたある適切な充填材料は、逆相クロマトグラフィー固定樹脂を含んだ。この樹脂は、走査電子顕微鏡により測定したように、粒子の直径が1.5から4.0 μ mまでの範囲に及ぶ多孔質C-18樹脂であるSpherisorb ODS 1(英国、フリント州のPhase Separations社)であった(ODS ビーズ12)。約0.003g/mlのODS 1のスラリーをアセトニトリル中に調製した。このスラリーを用いて、充填材料リザーバ3に供給し、その後、チャンバ4を充填した。

【0061】

ある溶媒および添加剤の組合せが、充填材料が充填されたチャンバ内に留まるのに役立つことが分かった。例えば、ODS ビーズをアセトニトリル中に導入する場合、それらは容易に流動するが、一方で、その後、水性またはほぼ水性の溶媒に切り換えると、ビーズが凝集し、チャンバ内に捕捉されるようになる。ODS ビーズに関して、充填床を不安定化する点まで観察される凝集を乱さずに、30%までのアセトニトリルが水溶液中に存在できた。50%までアセトニトリルが存在すると、凝集がわずかに損失し、充填床がわずかに不安定化された。別の例として、タンパク質Gまたはタンパク質Aが被覆されたビーズは水溶液中で凝集体を形成した。このために、それらビーズを捕捉区域中に導入することが難しくなった。しかしながら、Tween 20またはBrij 35(両方とも登録商標)

のような中性界面活性剤を添加すると、そのような凝集が防がれ、前記ビーズを導入できた。逆に、界面活性剤をその後水性溶媒から除去すると、凝集が生じ、捕捉された床の安定性が向上した。以下の傾向が観察された：非極性または部分的に非極性のビーズ相（例えば、ODSおよびタンパク質被覆ビーズ）を使用する場合、溶媒の表面張力を、有機溶媒または界面活性剤のような有機添加剤を添加することにより、水または緩衝水の表面張力よりも低下させると、凝集する傾向が減少した。反対に、より小さい表面張力を有する材料を水溶液から減少させるまたは除去すると、ビーズを床上の適所に固定する傾向が上昇し、これらデバイス内のビーズ捕捉を向上させるための「溶媒固定」法が形成された。メタノール、エタノール、ジメチルスルホキシド、炭酸プロピレン等のような、水と混和性のある、アセトニトリル以外の有機溶媒をこれらの目的のために使用してもよい。ビーズ上または試料中に存在するかもしれないタンパク質と相溶性である限り、中性界面活性剤の代わりに、荷電された界面活性剤を用いてもよい。

【0062】

磁気充填に関して用いられる磁気ビーズが、Abeba w-タンパク質「A」被覆ビーズ：スチレンおよびジニルベンゼンからなるコポリマーマトリクス（カリフォルニア州、Prozyme）内に分散された36-40%の磁鉄鉱の組成を含んでもよい。また、mRNAの単離のために、Guifeng-oligo(dT) 25被覆ビーズを用いてもよい。これらビーズは、ビーズ全体に亘り磁気材料（Fe₃O₄およびFe₂O₄）が均一に分散している。ビーズは、前記磁気材料（ノルウェー国、オスロのDynal社）を収容するポリスチレンにより被覆されている。

【0063】

器具の使用

本発明の実験を実施する際に、様々な器具を用いた。これらの器具およびその操作は当業者によく知られているので、短い記載のみが与えられ、それら器具は図面に示されていない。

【0064】

オンチップでのビーズの充填および全ての液体の取扱いに必要な電気泳動電圧を制御するのに用いた電源およびリレー装置は、以前に記載されていた [Fluri,

K., Fitzpatrick, G., Chiem, N. and Harrison, D. J. Anal. Chem. 1996, 68, 4285-4290]。LabVIEWプログラム(テキサス州、オースチンのNational Instruments社)は、電圧装置のコンピュータ制御のため、およびデータ獲得のために書かれた。

【0065】

この実験に用いたレーザ誘発蛍光検出装置は、4.0mWで動作する、488nm領域のアルゴンイオンレーザ(カリフォルニア州、サンホセのUniphase社)、および関連する集束光学素子から構成されていた[Manz, A., Miyahara, Y., Miura, J., Watanabe, Y., Miyagi, H. and Sato, K. Sens. Actuators 1990, B1, 249-255](カリフォルニア州、アービンのMelles Griot社)。BODIPY試料(上述した)から発せられた蛍光を、25倍、0.35NAの顕微鏡対物レンズ(ドイツ国、Leitz Wetzlar社)により集めた。画像をSONY CCD-IRISカメラにより観察した。あるいは、チャンバ4と充填材料リザーバ3との間の狭い通路5をモニターできるように位置した検出器として、530nmの発光フィルタおよび光電子増倍管(PMT)(ニュージャージー州、ブリッジウォーターのHamamatsu, R1477)を用いた。チャンバ4に隣接した主要通路11の部分からデータを採集した。堰6は、ちょうど視野から外れていた。PMTは530Vでバイアスされており、一方で、PMT信号は、増幅され、フィルタリングされ(25Hz Butterworth)、50Hzの周波数でサンプリングされた。

【0066】

緩衝液、アセトニトリル、および緩衝液とアセトニトリルの両方における1.0nMのBODIPYの蛍光を、島津RF-5301PC蛍光分光光度計を用いて測定した。

【0067】

上述した様々な器具に関して、特定のモデルおよび製造業者が与えられているが、当業者には、どのような適切な機能的同等物を用いてもよいことが理解されよう。

【0068】

チップの操作

図1 Aおよび1 Bを再度参照する。充填材料リザーバ3からチャンバ4中に至る狭い副通路5を用いて、界面動電ポンプ輸送を用いて、固定相の充填材料をチャンバ4中に向けた[Yan, C., 米国特許第5,453,163号,1995; Knox, J.H. and Grant, I.H. *Chromatographia* 1991, 32, 317-328]。上述したように、基板8は非導電性であり、これにより、界面動電ポンプ輸送法を用いて、ピーズ12を充填することができる。

【0069】

デバイス10は、使用前に、どのような水溶液によっても状態調節されていなかった。チャンバ4、通路5、11、およびリザーバ1、2、3には、最初に、アセトニトリルを満たした。充填材料リザーバ3中のアセトニトリルを、ODS/アセトニトリルスラリー(上述の)と置換し、次いで、主要リザーバ1および2をアースしながら、充填材料リザーバ3に正の高電圧を加えることにより、チャンバ4にODSピーズ12(図2)を充填した。充填材料リザーバ3に加えられた電圧は、チャンバ4の充填を行うために、約5分間に亘り200Vから800Vまで上昇させた。

【0070】

チャンバ4が一旦充填されたら、段階勾配を実施して、水溶液を主要通路11に、ODSピーズをチャンバ4内に導入した。リザーバ1および2中には、アセトニトリルおよび緩衝液の1:1(v/v)混合物を配置した。アセトニトリルにより、充填材料リザーバ3内のスラリーを置換した。次いで、主要リザーバ1に電圧を加え、200Vから800Vまで上昇させた。このとき、充填材料リザーバ3は400Vにバイアスされ、主要リザーバ2はアースされていた。800Vでの2から5分後、リザーバ1および2中のアセトニトリル/緩衝液の混合物を緩衝液と置換し、同じ電圧プログラムを繰り返した。チャンバ4を目視でモニタして、アセトニトリルが緩衝液により完全に置換されたこと、並びに充填材料(ピーズ12)がこの過程中にシフトしたり、除去たりしなかったことを確認した(アセトニトリルが排出されたときに、ピーズ12が塊状になるのが分かり、水/アセトニトリルの界面での屈折率変化が明らかに見えた)。行った実験が、以下に詳細に説明されている。

【0071】

実験結果および議論

実験を行うために、図2Aに示したように、チャンバ4に充填材料（ビーズ12）を充填する必要があった。

【0072】

図1Aおよび1Bに示した狭い副通路5は、チャンバ4に充填材料（ビーズ12）を供給するために、約30 μ m幅に作製した。次いで、試料を、リザーバ2（入口通路）から、チャンバ4を横切って、主要リザーバ1（出口通路）に向かって供給できた。チャンバ4の容積は330 p lであり、一方で、出口通路および入口通路の容積は、それぞれ、 1.5×10^{-7} lおよび 4.1×10^{-8} lであった。主要通路11は、堰6、7があるにもかかわらず、狭い通路5（30 μ m）の幅と比較して比較的広い幅（580 μ m、堰で300 μ mまで狭くなる）を考慮して、副通路5よりもずっと小さい流れ抵抗を有した。デバイス10内の相対的流れ抵抗は、試料の装填および溶離の最中の狭いビーズ導入副通路5中への流動よりもむしろ、主要リザーバ1および2の間の流動を促進するために、これら通路5、11に関する幅寸法を選択することにより操作した。

【0073】

逆相ODSビーズ12（前述の）を、タンパク質、ペプチドおよびトリブシン消化物のクロマトグラフィー [Seifar, R. M.; Kok, W. T.; Kraak, J. C.; and Poppe, H. Chromatographia, 1997, 46, 131-136. Yan, .; Dadoo, R.; Zhao, H.; Zare, R. N.; and Rakestraw, D. J., Anal. Chem. 1995, 67, 2026-2029]、並びにSPEおよびCECの他の用途 [Nielsen, R. G.; Riggins, R. M.; Rickard, E. C. J. Chromatogr. 1989, 480, 393-401. Hancock, W. S.; Chloupek, R. C.; Kirkland, J. J.; Snyder, L. R. J. Chromatogr. A 1994, 686, 31-43] に関する拡張使用のために、SPEデバイスに用いた。従来のキャピラリーの界面動電充填は以前に記載されており [Yan, C.; 米国特許第5,453,163号, 1995. Knox, J. H.; Grant, I. H. Chromatographia 1991, 32, 317-328.]、本発明者はその方法を本発明に適応した。

【0074】

先に手短かに説明したように、充填方法は、主要リザーバ1および2をアースし

ながら、充填材料リザーバ3に正の電圧(200-800Vに上昇)を加える工程を含んだ。加えられた電圧により、EOFがビーズ通路を下流に流動し、ビーズを空洞中に運んだ。クロマトグラフィービーズ12を懸濁させ、それらが凝集し、狭い副通路5を塞ぐのを防ぐために、有機溶媒が必要であった。研究により、アセトニトリルが満たされたキャピラリーは、実質的な電気浸透流動を示すことが分かった[Wright, P. B.; Lister, A. S.; Dorsey, J. G. Anal. Chem. 1997, 69, 3251-3259. Lister, A. S.; Dorsey, J. G.; Burton, D. E. J. High Resol. Chromatogr. 1997, 20, 523-528. Schwer, C.; Kenndler, E. Anal. Chem. 1991, 63, 1801-1807. Salimi-Moosavi, H.; Cassidy, R. M. Anal. Chem. 1995, 67, 1067-1073]。

【0075】

図3Aに示したように、充填の初期段階で、チャンバ4に進入するビーズ12は、チャンバ4の両側の堰6, 7に接触した。先に説明したように、堰6, 7の頂部からカバープレート9の底部までの距離(約 $1.0\mu\text{m}$)は、ODSビーズ12の個々の粒子の直径(約 $1.5\text{--}4.0\mu\text{m}$)より小さいので、ビーズ12は堰6, 7を越えることができない。

【0076】

図3Bに示したように、チャンバ4は、クロマトグラフィー材料により完全に満たされるまで、充填され続けた。前述したように、充填材料を保持するための再現可能にフリットを製造することに関連する難点はよく知られている。重要なことに、本発明に使用される堰の設計は、この問題を回避し、ビーズの界面動電充填により、観察できるほどの空隙なく、チャンバ中に亘りビーズを均一に分布させた。実際に、堰構造体を使用すると、カラムのフリット製造の必要が最終的になくなるであろう。

【0077】

本発明の堰の設計により、ビーズを満たしたときに、2つの堰により形成された捕捉区域に亘り、堰で気泡を形成させずに、 $20,000$ から $80,000\text{V}/\text{cm}$ ほど高い範囲の電場を加えることができる。これらの堰を有するデバイスに行った分離では、少なくとも $15,000\text{V}/\text{cm}$ ほど高い電場を用いることができる。堰を横切って消散されたパワーは、気泡を形成することなく、 $3\text{--}7\text{W}/\text{m}$ ほど高くても差

し支えない。これとは対照的に、従来のカラムに形成されたフリットは、せいぜい、 $0.6\text{W}/\text{m}$ より大きいパワー消散で気泡を形成することが報告されてきており、気泡を形成しないことが報告されている、 $150\text{--}600\text{V}/\text{cm}$ の範囲の電場がせいぜいである。

【0078】

外部キャピラリーをチップに結合させ、外部クロマトグラフィーキャピラリー内に充填されたビーズの捕捉要素として堰を使用することが可能である。これは、Bigs等 (N. H. Bings, C. Wang, C. D. Skinner, C. L. Colyer, P. Thibeault, D. J. Harrison, Anal. Chem. 71 (1999) 3292-3296) により記載されたように、小さい死空間結合を用いて行うことができる。このようにして、チップベースの堰が、外部キャピラリー内に通常形成されるフリットを置き換えることができ、より高い電場を使用でき、速度および分離効率が改善される。

【0079】

(主要リザーバ1および2を真空中に引くことにより、空洞を充填することでもできるが、これは、試料装填および溶離のために界面動電流動が用いられる場合には、それほど都合よくないことに留意されたい。)

ある理由のために、ビーズ12が望ましいほどは詰まった状態に充填されなかった場合(図2および3Bに示すように)、それらは、単に電圧を逆にすることによりチャンバ4から除去され、次いで、充填方法を繰り返した。一旦水溶液がチャンバ4に導入されたら、逆相ビーズ12は、凝集する傾向にあり、除去するのがより難しかったことに留意されたい。しかしながら、その後の除去は、EOFまたは真空、もしくはそれら2つの組合せのいずれかを用いて、その水溶液をアセトニトリルでフラッシュすることにより行った。都合よくは、ビーズ12をチャンバ4から効果的に除去する能力により、使用済みクロマトグラフィービーズを回復させることができる、またはより効力のある材料を代用できる。

【0080】

重要なことには、チャンパの入口に屈曲構造体13を利用した設計(図1Bおよび3A)により、充填において最も好ましい結果が得られ、チャンバ4を充填し、電圧または真空の除去または変更後にもそのままにすることができる。それら

の図面から分かるように、副通路5は、堰6、7に対して非対称様式でチャンバ入口4Aを介してチャンバ4に接続している。また、屈曲構造体13は、好ましくは、副通路5からチャンバ4への充填材料の直接の見通し線進入を妨げる。むしろ、屈曲構造体13は、充填材料を、チャンバ入口4Aを介して、チャンバ4に間接的に進入させる。

【0081】

先に説明したように、充填段階中、充填材料リザーバ3は、リザーバ1および2をアースした状態で、正のバイアスが加えられている。屈曲構造体13により、電場線が、空洞中への湾曲した通路にしたがうと考えられる。その結果、クロマトグラフィーピーズ12が電場線にしたがってチャンバ4A中に入るときに、まるで降雪機からのように「吹き付けられ」（図3A）て、均一に充填されるようである。

【0082】

充填方法の最中に、チャンバ4は、屈曲構造体13の始めの部分までしか充填されなかった（図3B参照）。一旦充填されると、ピーズは、狭い副通路5の側部を下流に流れ、中央部を上流に流れて（充填材料リザーバ3に向かって）、閉じた電気泳動装置において生じる溶媒の逆流を模倣するのが観察された【Shaw, D. J. *Introductio to Colloid and Surface Chemistry*, 3rd ed. Butterworths: London, 1980】。そのような閉じた系において、EOFは、チャンバの端部に到達するまで、壁に沿って向けられ、そこで、圧力により、溶液が方向を逆転し、ピーズ導入通路の中央を逆流する。

【0083】

図示した屈曲構造体の重要な面は、捕捉区域中への非対称進入であり、これにより、充填が良好になる。対称入口は、進入しているピーズが両方の堰に等しく進むことができ、これにより、充填が不均一になったり、難しくなったりする傾向にある。非対称構造体により、ピーズは、最初に、捕捉区域の一方の端部に優先的に充填され、次いで、その位置から一方向に蓄積することができる。屈曲構造体の重要な役割は、充填床の使用中に、捕捉区域からの直線流出を防ぐことにある。

【0084】

入口に非対称がなく構築されたチャンバは、非対称進入設計ほど良好に充填されると観察されなかった。これらの場合、充填材料は、入口から最も遠い角部に充填する傾向にあったが、追加の材料がチャンバに進入することがない様子であった。対称設計のために、この型のチャンバは、ある程度まで充填された後に、溶媒の逆流を示すと考えられる。すなわち、ある程度充填されたチャンバは、閉じたすなわち制限された系に似ているようである。そのような出来事は、対称チャンバのピーズによる充填を不可能にするであろうし、Shawにより説明されたように、以前に観察された挙動と一貫性がある。そのような挙動は、ある場合には対称構造体を満たすが、他の場合にはそれほど容易に満たせない能力の理由を説明しているであろう。これとは対照的に、入口を保護している屈曲構造体13の有無にかかわらず、非対称設計は、狭いピーズ導入通路5中への直接の逆流を経験することが少ないようである。

【0085】

固相抽出 (SPE) オンチップ

先に説明したように、本発明により、微小流体分析装置の用途を拡張することができる。そのような拡張の1つは、直接オンチップでのSPEを容易にすることである。予備濃縮は、微小流体デバイスの感度を向上させるのに使用できる価値のある手段である。分析物を予備濃縮するためにマイクロチップ上に構成した充填SPE床の能力を測定するために、本発明者は、50mMのリン酸緩衝液からのBODIPY試薬の1.0nM溶液を濃縮した。使用した溶液条件は、HPLC-CE装置においてタンパク質およびペプチド分析に関して用いたものと同様であった [Bushy, M. M.; Jorgenson, J. W. Anal. Chem. 1990, 62, 978-984. Castagnola, M.; Cassiano, L.; Rabino, R.; Rossetti, D. V. J. Chromatogr. 1991, 562, 51-58.]。BODIPY試薬は、緩衝水溶液中に希釈した場合、ODS材料に関して高い親和性を示し、優れた蛍光物質である。BODIPY試薬の予備濃縮および溶離は四段階で行った：SPE床の緩衝液による平衡；試料の導入；緩衝液のフラッシュ；および分析物の溶離。

【0086】

充填床をリン酸緩衝液により濯いだ後、1.0 nMのBODIPY溶液を主要リザーバ1内に配置し、主要リザーバ2をアースした状態で、+200Vを2分間に亘り加えた。EOF (0.2 mm/秒 、 $1.2 \times 10^{-9} \text{ l/秒}$) がリザーバ2に向かって流動し、装填段階中に、BODIPYをSPE床上に運んだ。

【0087】

図4Aに示したように、吸収されたBODIPYの蛍光は、初めに、ピーズ12の最初の数層のみに生じた(図の上部近く)。図4Bは、1.5分後のSPE床を示しており、合計で 1.4×10^{-18} モルのBODIPY試薬がその床に充填された(染料が完全に捕捉されたとする)。BODIPYについて、ODS材料へのその高い親和性のために、試料の漏出は観察されなかった。実際に、目視での観察により、2分間に亘る1.0 nMのBODIPY溶液の濃縮後、5%のみのSPE床の物理的容積が用いられ、330 p lの床の容量は、約 2.8×10^{-18} モルの分析物であったことを示唆している。

【0088】

床(チャンバ4内)の通路11内に残留する試料を洗浄するために、装填後に、緩衝液洗浄段階を用いた。次いで、リザーバ1および2中の溶液をアセトニトリルと交換し、最初の装填段階と同じ方向に移動する溶媒により染料を溶離させた(または溶離段階中の潜在的勾配の逆転により、元の試料リザーバに向かって戻るように向けられた)。両方の工程はうまく機能したが、我々の試験にとっては、後者がより都合よい。図5は、床平衡後の、1.0 nMのBODIPY試料に関する3段階予備濃縮実験を図示している。90秒の装填段階は、図1Aに示したように位置する検出器が蛍光が通過したときの信号の増加を示した。この後に、60秒の濯ぎ段階を行った。次いで、アセトニトリルを用いて、装填されたのとは反対の方向に床からBODIPY試薬を溶離して、検出器の再位置決めを必要をなくした。BODIPY試薬は、90秒の予備濃縮段階後の比較的狭い3秒の帯域内に溶離され、元の試料と比較して、数倍の濃度上昇を示した。BODIPY (1.0 nM) 試薬の蛍光は、緩衝液とアセトニトリルの両方の中で試験し、いずれの溶媒についても、強度に著しい差を示さなかった。予備濃度因子(P. F.)は、方程式(1)を用いて推測できる：

【数1】

$$P.F. = \frac{V_i}{V_f} = \frac{t_{pre} \cdot f_{buff}}{t_{elute} \cdot f_{elute}} \quad (1)$$

ここで、 V_i は分析物含有緩衝液の容積であり、 V_f は分析物含有アクリロニトリルの容積である。 V_i は、予備濃縮時間 (t_{pre} 、秒) と濃縮されている試料の電気浸透流 (f_{buff} 、1/秒) との積であり、一方で、 V_f は、溶離された分析物のピーク幅 (t_{elute} 、秒) と溶離溶媒の流量 (f_{elute} 、1/秒) との積である。この場合、分析物は、少なくとも100倍だけ予備濃縮された。十分な濃縮後、BODIPYは、SPE床上に容易に目視により観察される。

【0089】

異なる試料の装填時間を用いて、予備濃縮の量を増加させた。実験において、120-532秒に及ぶ予備濃縮時間を研究し、80-500の予備濃縮因子を生じた。予備濃縮時間に対してプロットされたピーク区域 (rds 3-11%) は、研究した条件に亘り、線形の関係を生じた ($r^2 = 0.9993$)。

【0090】

キャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) オンチップ

先に説明したように、本発明により促進される別の用途は、オンチップのキャピラリー電気クロマトグラフィー (CEC) である。緩衝液で平衡にされたオクタデシルシランピーズ12が充填されたチャンパ4に、逆相モードのCECを行った。チップ設計内にインジェクタがないために、試料は、50mMの酢酸アンモニウム緩衝液、pH8.5中のクロマトグラフィー床の前方に装填した (上記「溶液および試薬」を参照のこと)。両方の化合物は、装填およびフラッシュ段階において分析物信号がないことにより示されたように、これらの条件下で完全に保持された。装填段階は、試料を導入し、床の前方に保持された分析物を濃縮するように機能した [Swartz, M.E.; Merion, M.; J. Chromatogr, 1993, 632, 209-213]。図6は、30%のアセトニトリル/70%の50mM酢酸アンモニウム水溶液の移動相組成物による、BODIPYおよびフルオレセインのCEC分離に含まれる3つの段階を示している。一旦混合移動相が床に到達したら、両方の化合物は、クロ

マトグラフィーを経験し始め、床から溶離される。それら化合物は、 $200\mu\text{m}$ 未満のクロマトグラフィー床上で20秒未満で、完全に溶離され、分離されて、フルオレセインのピークに関して $2\mu\text{m}$ のプレート高さ ($N=100$ プレートまたは 50000 プレート/ m)を生じた。これらの条件下において、フルオレセインは、BODIPYより先に溶離される。ピークは、標準物の保持時間を混合物のものと比較することにより同定された。 $\text{pH}8.5$ では、フルオレセインは実効(-2)電荷を有し、一方で、BODIPYは中性である。通常のCEC分離において、フルオレセインの電気泳動移動度は、EOFに対抗し、BODIPYをフルオレセインよりも先に溶離させるであろう。この場合、2つの成分の溶離順序は逆になり、分析物と固定相との間の相互作用を示す。より疎水性の強いBODIPYは、フルオレセインよりも高い、クロマトグラフィー材料に関する親和性を有し、BODIPYをより長く保持し、遅く溶離させる。

【0091】

最後に、図7A-7Dは、異なる濃度のアセトニトリルの移動相を用いた、BODIPYとフルオレセインとのCEC分離を示している。アセトニトリルの濃度が上昇すると、移動相の極性が低下し、BODIPYが溶離するのに必要な時間が減少するのが観察された。フルオレセインの溶離時間は変化せず、低い%のアセトニトリルを除いて、クロマトグラフィー保持がほとんどまたは全くないことを示している。アセトニトリル濃度を減少させると、基線解像度(baseline resolution)が得られるが、より広い帯域の広がりに導かれる。

【0092】

これらの結果は、チップ上の開放管CECについて報告されたものに匹敵する [Jacobson, S. C., Hergenroder, R., Koutny, L. B., Ramsey, J. M. Anal. Chem. 1994, 66, 2369-2373. Kutter, J. P.; Jacobson, S. C.; Matsubara, N.; Ramsey, J. M. Anal. Chem. 1998, 70, 3291-3297. He, B., Tait, N., Regnier, F. Anal. Chem. 1998, 70, 3790-3797.]

。

【0093】

ビーズベースの試薬を用いた免疫測定

ビーズ上の免疫測定、または免疫吸着測定は、ビーズの表面上への抗体または

抗原いずれかの配置を含む。抗原を含有する溶液がビーズを通過するとき、抗原は抗体に特異的に結合する。このようにして、抗体に関する抗原の特異性を用いて、抗原を溶液中の他の種から分離する。その後、抗体または抗原がビーズから溶離され、複合体または遊離抗体のいずれかとして検出されるように、溶液の条件が変更される。チップ上の免疫吸着測定の開発は、消費される試薬の量が少ないために、魅力的である。それに加え、マイクロタイプレートまたはイムノビーズが充填されたシリンジに行われる従来の方法と比較して、マイクロチップは、非常に速い分析時間を示す。オンチップの免疫吸着測定はまた、オンチップの液相免疫測定よりも低い濃度検出限界を与え、ビーズベースのオンチップ免疫測定の開発が重要になる。

【0094】

特異的酵素が結合したビーズは、2つの堰により形成されたチャンバ中に充填される。通路の壁の表面積とは対照的に、ビーズの表面積は大きいので、ビーズを使用するのが好ましい。表面積が大きくなると、容量が大きくなり、分析物の捕捉もより効率的になる。前記堰は、充填される免疫測定ビーズのための明確なチャンバを形成する。本発明者により、酵素のテオフィリンに関するチップ上のビーズベースの免疫測定が示された。実験において、タンパク質Aにより被覆された磁気ビーズがチップのチャンバ内に充填される。その後、抗体（抗テオフィリン）が、1mMのトリシン緩衝液 pH8.0中の床に流される。抗テオフィリンが充填床を流動するときに、抗体はタンパク質Aに結合する。抗テオフィリンを、床が抗体で飽和されていることを確実にするために、数分間に亘り床を通過させた。次いで、緩衝液洗浄段階を用いて、チャンバおよび通路から、残留する未結合抗体を除去した。抗テオフィリンに結合する床に流動させることにより、蛍光ラベルされたテオフィリン（キットから希釈された）により床を飽和させた。床が飽和された点は、床の下で蛍光をモニタし、漏出曲線（図11）が平坦状態に達した点を測定することにより求めた。漏出後、緩衝液フラッシュ段階を用いて、デバイスからテオフィリン溶液を洗浄した。次いで、遊離タンパク質またはテオフィリン/抗体の複合体のいずれかとして、床からテオフィリンを溶離させるために、カオトロピック剤を加える。カオトロピック剤は、様々な種類のもの

であって差し支えないが、この実施例においては、90%のアセトン／10%のトリシン緩衝液の混合物を用いた。一旦カオトロピック剤が充填床に到達したら、テオフィリンは、比較的狭い帯域で溶離する(図12)。

【0095】

通常は、これらの条件下で競合測定が行われるが、直接測定は、免疫測定床として機能する、堰により形成されたチャンパの能力を示す。

【0096】

酵素反応床

ビーズのような固体支持体に酵素を固定化する方法がいくつか開発されてきた。一旦固定化されたら、酵素ビーズを床中に充填して、溶液がそこを流されて流されるときに、化学反応を起こすことができる。通常は、基質を含有する溶液が床に流される。この基質が酵素と接触するときに、酵素は基質と反応して、生成物を生成する。固定化された酵素と基質との反応から生じた生成物は、後に、検出方法または他の合成プロセスに使用できる。この実施例では、多孔質シリカビーズ(5 μ mの直径)上に固定化された酵素の西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)とキサンチンオキシダーゼ(XO)の使用を説明する。これらの結果は、酵素は、ビーズ上に一旦固定化されたら、堰デバイス中に捕捉／充填することができ、そこで、まだ活性であり、酵素反応床として使用できることを示している。

【0097】

XODおよびHRPを、グルタルアルデヒド(シグマ社)と架橋させることにより、3-アミノプロピルトリエトキシシランによりシラン化されたNucleosil 1000-5シリカビーズ(ドイツ国、Machrey-Nagel)上に固定化した。ガラスビーズ上への酵素の固定化は、以前に記載されており、当業者に知られている。全ての研究は、1MのNaOHによりpH9に調節された50mMのホウ酸を用いて行った。

【0098】

HRPおよびXODの固定化を行って、2つの重要事項を示した。第1は、堰デバイス内に酵素の固定化されたビーズを充填する能力であり、第2は、酵素がまだ活性であり、一旦充填されたら反応に触媒作用を及ぼすのに用いられること

を示すことにあった。これらの本質の各々を示すために、堰デバイスを用いて、化学発光反応を行った。

【0099】

固定化された酵素を充填する能力により、ある分析物について異なる検出方法を使用することができる。例えば、少量の分析物しか利用できない場合、またはそうでなければ標識付け反応を実施するのが難しい場合、非常に感度の高い測定のために、ルミノール化学発光（CL）反応を使用できる。CL反応は、光源を必要とせず、検出スキームを単純にするという点で独特である。HRPにより触媒作用が及ぼされる化学発光反応が以下に示されている。

【0100】

【化1】



HRPが固定化されたビーズを堰デバイス中に充填し、反応のための試薬を含有する溶液を床に流した。固定化されたHRPは、 H_2O_2 (100M) およびルミノール (10mM) の溶液を、固定化されたHRPを含有するビーズが充填された床に流したときに、化学発光反応に触媒作用を及ぼすことが分かった。この反応により生じた光は、酵素床の下流で検出された。

【0101】

しかしながら、連続試行の各々において、CL反応から生じた光は、以前の試行（図11）よりも低かったことが分かった。これはおそらく、連続試行により、酵素の活性が減少したことにより生じたのであろう。これらの結果は、堰デバイス内のODSビーズの交換について論じられたように、使い尽くされたビーズを新たなものと交換する方法の利点を証拠付けている。

【0102】

代わりの実施の形態

本発明による設計の2つの堰の実施の形態をこれまで説明してきたが、他の実施の形態も可能である。例えば、オンチップリアクティブビーズを形成するために、1つの堰の設計を実施することもできる（すなわち、主要通路11内の上流に位置

する第2の堰6を有さない)。具体的には、主要通路を横切って形成された下流堰7を提供し、下流方向にのみ圧力を加える(すなわち、主要リザーバ2および副通路3から主要リザーバ1に)ことにより、下流堰7に対して充填が行えることが分かる。しかしながら、1つの堰の設計により、SPEまたはCECに用いたときの分離効率を減少させる、充填床にでこぼこの前縁が形成されるかもしれないことに留意されたい。さらに、小さなビーズの長い床に関連する高い背圧により、充填の長さが約4-6mmに制限された。マイクロチップの高圧勘合を用いれば、高圧ポンピングが可能になり、いくぶん長い長さが可能になるであろう。

【0103】

1つの堰の設計を用いた充填床を形成するために、他の種類の力を用いてもよい。例えば、下流方向のみに向けられた(すなわち、主要リザーバ2および充填材料リザーバ3から、主要リザーバ1に)、界面動電力を用いて、制限された程度の充填(数ミリメートルの長さまで)を行うことができた。

【0104】

堰の数を変更することに加えて、図8A-8Cの本発明の代替の実施の形態に示したように、チャンバに1つより多い入口または出口を設けることもできる。

【0105】

図8Aにおいて、チャンバ4が2つの堰6、7の間に形成されている。2つの副通路5a、5bが、チャンバ4への入口または出口として働くように設けられている。図示したように、副通路5a、5bは、チャンバの充填を良好に促進するように、互いに対してずれていてもよい。ビーズを、捕捉区域の他端から捨てるためにフラッシュで排出できるように、またはフラッシング剤を代替のリザーバから供給できるように、第2の副通路が加えられる。後者の設計により、使用済みビーズが、新しいビーズ流を汚染するのを防ぐ、および/または試料溶液および試料廃物溶液が、フラッシュ中に捕捉区域中に向けられるのを防ぐことができる。

【0106】

図8Bに示すように、この設計における副通路は、副通路5bがビーズをフラ

ッシュできるように、または捕捉区域からフラッシュにより排出されているビーズが、例えば、充填材料リザーバ3中への代わりに、廃物リザーバ（図示せず）中に向けられるように、1つ以上に随意的な分岐5cを有してもよい。

【0107】

別の実施の形態が図8Cに示されている。ここでは、ビーズを通過させずに流体が流動できるように、第3の副通路5dのチャンバ4への入口近くに、副通路堰16が設けられている。この「堰を備えた」副通路5dは、例えば、特に、チャンバ4の長さ（堰6、7の間で測定された）が4-6mmよりも大きい場合、ビーズの装填中にチャンバ4内に強まる圧力を解放するために、使用してもよい。

【0108】

図8A-8Cに示した3つの実施の形態全てにおいて、チャンバ4中への副通路の入口は、「見通し線」流動を副通路からチャンバ4中に、またはその逆に向けるのを防ぐために、前述したように、屈曲または類似の形状を含むように改良されてもよい。前述したように、この入口の改良は、充填を補助するためにビーズを捕捉区域中に吹き付けるように働き、かつ後の使用中にビーズがチャンバ4から排出される傾向を減少するように働く。

【0109】

図8A-8Cに示したように、1つより多い副通路によるビーズの装填は、界面動電装填を使用した場合に、これらの副通路中への流動を防ぐように追加の副通路にも電圧を加えなければならないことを除いて、1つの副通路および2つの堰を有する設計に関するものと同じ様式で行われる。ビーズの除去中に、捕捉区域すなわちチャンバ4からビーズを吐き出させるために、第2の副通路（例えば、図8Aの副通路5b）に電圧を加えてもよく、1つの副通路の設計に用いたものであるが、追加の副通路における電圧降下に関して調節されたもののような電圧が加えられる。認識されるように、フラッシュ段階中の流動方向は、加える電圧の極性により制御できる。

【0110】

ビーズを装填するために圧力駆動流れを使用する場合、装填中に追加の副通路に背圧を加えなければならない、そうでなければ、追加の副通路に取り付けられ

たりリザーバを一時的に密閉してもよい。チャンバ4からビーズをフラッシングする場合、1つ以上の副通路からビーズをフラッシュするように、ビーズ供給通路5aに圧力を加えてもよい。

【0111】

多数の副通路の設計および界面動電力を使用してSPEまたはCECを行う場合、捕捉区域における1つの副通路について説明したのと実質的に同じ様式で、捕捉区域からと、副通路中への試料またはビーズの漏れを防ぐように、追加の副通路に電圧を加えてもよい。圧力駆動ポンピングを使用する場合、副通路は、副通路中への流動を除去するように加えられる十分に正の圧力を有してもよく、そうでなければ、それぞれの副通路に取り付けられたリザーバを一時的に密閉しても差し支えない。

【0112】

ポリマーによる充填ODSビーズの固定化

界面動電、磁気または圧力の充填技法を用いてクロマトグラフィー床にビーズを充填した後、これらの充填技法の内の1つを用いて、ビーズ導入通路の適当な部分にビーズを充填した。次いで、リザーバ内の過剰なビーズを除去した。次いで、約40mlのモノマー混合物を、ビーズリザーバ中にピペットにより入れ、ビーズに向かって、ビーズ導入通路に沿った圧力または界面動電流により配送した。この段階中、ビーズ導入通路内のある領域における屈折率の変化を用いて、モノマー溶液の位置をモニタし、モノマーが充填ビーズ床に到達する十分前に、流動を停止した。

【0113】

一般的なモノマー溶液は以下のように調製する：10重量%のH₂O、40重量%の1，4-ブタンジオールおよび50重量%の1-ブロパノールを含んだ3成分溶媒混合物800mlを収容したバイアルに、2，2'-アゾビスイソブチロニトリル(AIBN、2重量%)およびエチレンジメタクリレート(EDMA)の混合物200mlを加えた(C. Peters et al., Anal. Chem. 1997, 69, 3646-3649)。次いで、モノマー溶液を15分間に亘りN₂でバージして、溶解酸素を除去した。他の重合性モノマー溶液を用いてもよい。

【0114】

次いで、このデバイスを24-48時間に亘り60℃でオープン内に保持した。デバイスをオープンから取り出して、室温まで冷ました。このとき、全てのリザーバは、蒸発を防ぐために蓋がされていた。あるいは、AIBNまたは他の開始剤による光開始重合を用いて、デバイスを長期間に亘り加熱する必要なく、モノマー溶液を重合させてもよい。重合後、デバイスをアセトニトリルで濯ぎ、次いで、緩衝液で濯いだ。ビーズ床を不安定にせずに、そのようなデバイスに、100%までのアセトニトリルの移動相組成物を使用できた。

【0115】

寸法の指標

本発明により設計した微小流体デバイスの様々な寸法の理論的制限は知られていないが、本発明者は、以下に論じる実的な目的に関するいくつかの一般的な指標を採用した。

【0116】

捕捉区域の長さは、約10 μ mから約200cmまでのいずれに及んでもよいと考えられる（必要であれば、1つのデバイスウェハーの範囲内にそのような長さを含まれるようにするために、螺旋状または曲がりくねった通路を使用することにより）。必要とされる捕捉区域の長さは、用途に依存し、充填および排出を行うために加えられる力によっても制限される。例えば、オンチップのCECには、比較的長い捕捉区域が必要であり、好ましい上限は、約5cmである。

【0117】

捕捉区域、試料通路および廃物通路の深さに関しては、実的な範囲は、約400 μ mから約0.25 μ mまでであると推測される。より好ましくは、その上限は約100 μ mであるべきであり、下限は、最低の実的な深さよりも約10%大きいべきである。

【0118】

また、詰まる傾向を減少させるために、ビーズ配送通路およびビーズ廃物通路（副通路5、5a-5d）は、好ましくは、ビーズの直径よりも、少なくとも約3倍深く、少なくとも3倍広いべきである。

【0119】

副通路5, 5a-5dの最大寸法もまた、必要とされる相対的な流れ抵抗（すなわち、使用中の副通路の逆流を最小にするように、副通路対主要通路および堰の流れ抵抗）に依存する。一般的に言えば、副通路の流れ抵抗は、逆流問題を最小にするために、堰の流れ抵抗よりも高いべきである。

【0120】

添付の表は、圧力駆動流れを用いた、流動通路深さ、堰深さおよび副通路長さの関数としての、捕捉区域から出る容積流量への通路寸法および堰寸法の計算された影響についての情報を与える。

【0121】

以下の表において、通路Wと称されるのは、図1Aの要素1であり；通路Cと称されるのは、図1Aの要素5であり；通路C'と称されるのは、図1Aの要素3である。

【0122】

【表1】

図1Aへの相関関係		幅	長さ
	20 μ mの深さ		
要素1	通路W	600	6,500
	堰	280	不定
要素5	通路C	50	不定
要素3	通路C'	600	3,500
	10 μ mの深さ		
要素1	通路W	580	6,500
	堰	280	不定

容積流量は、矩形通路断面に関するナビエ・ストークスの方程式および通路形状の影響のペリー(Perry)の表の値を用いて推測した。半分の幅aおよび半分の深さbを有する通路の流れ抵抗が方程式2により与えられる：

【数2】

$$\Delta P/U = hL/a b N \quad (2)$$

ここで、 ΔP は長さ L の通路部分に沿った圧力降下であり、 U は平均線形流速であり、 h は粘度であり、 N は断面比 b/a ($b < a$) に依存する形態要因である。要因 N は、圧力駆動された放物線流動に関するナビエ・ストークスの方程式に対する解から推測してもよく、Chemical Engineer's Handbook, (3rd edition, 1950) 387頁にペリーにより表にされていた。デバイス設計における目的は、表における副通路 C の抵抗を、堰および後の流動通路 W の抵抗よりも高くすることにある、したがって、堰を横切る流動が好ましい。流動要素が直列にある場合、各々の部分に関して方程式1の右側により与えられる流れ抵抗を、連続電気インピーダンスの抵抗を加えられるような様式で加えられる。流体要素が平行にある場合、平行の電気抵抗について行われるように、全インピーダンスの逆数を得るために、それらの流れ抵抗の逆数を加えることができる。通路または複数の通路の組合せを通る容積流量 Q は、方程式3により与えられる。

【0123】

【数3】

$$Q = a b \Delta P / R f \quad (3)$$

ここで、 $R f$ は、上述した全ての通路部分に関して、互いに組み合わせられる、方程式1の右側により定義される流体流れの抵抗である。堰を横切る容積流量 Q_w 対副通路中への容積流量 Q_c に対する比 r ($r = Q_w / Q_c$) は、堰を横切って流れる溶液の比率 ($Q_w \% = 1 / (1 + r)$) が高いことを確実にするのに大きいべきである。このことは、表に示したいいくつかの計算を広い主要通路と比較して長く狭い副通路を用いることにより、他の通路の深さに対する堰の深さを上昇させることにより、主要通路に対する副通路の深さを減少させることにより行うことができる。

【0124】

【表2】

10および20 μm の深さの設計に関する容積流量

通路の深さ	通路Cの長さ	堰の深さ	堰の長さ	容積比 r	% Q_w
20 μm	15,000	3	20	12.58	92.6
	25,000			20.85	95.4
	15,000		10	18.75	94.9
20 μm	15,000	1	20	0.687	41.1
	25,000			1.16	53.6
	15,000		10	1.37	57.8
10 μm	15,000	3	40	38.9	97.5
	25,000			63.7	98.5
	15,000		30	41.7	97.7
10 μm	15,000	1	40	4.14	80.5
	25,000			6.87	87.3
	15,000		30	5.83	84.3

【表3】

所定の縁深さに関する計算のための固定デバイス寸法

	幅	長さ
20 μm の深さ		
通路W	600	6,500
堰	280	不定
通路C	50	不定
通路C'	600	3,500
10 μm 深さ		
通路W	580	6,500
堰	280	不定
通路C	30	不定
通路C'	580	3,500

一体化分析方法

上述した本発明の様々な特徴は、より複雑な微小流体設計に使用されるであろうことが認識される。

【0125】

図9は、各々が異なる機能を有する、いくつかの捕捉区域が組み込まれた、一般に20により示される、多数の堰および多数の副通路の設計を示している。

【0126】

例として、堰6 aおよび6 bの間に形成された第1の捕捉区域25において、特定のタンパク質に対する抗体が装填されたビーズが、副通路24により導入される（副通路26を通して排出される）。細胞溶解産物または血清試料もしくは他のタンパク質源が、試料リザーバ（図示せず）から供給され、試料入口21および入口通路38を介してチップに装填される（試料は、試料出口22から除去され、溶離液入口23も、入口通路に設けられる）。次いで、試料は、捕捉区域25内の抗体ビーズ床に流れ込み、特定のタンパク質を単離し、一方で、流出液は廃物出口27に向けられる。

【0127】

次いで、アセトニトリルと水の混合物のようなカオトロピック溶離剤が導入されて（溶離液入口23）、カラムからタンパク質を溶離させ、これを、次の捕捉区域30（堰6 cおよび6 dの間に形成された）に配送し、そこで、この区域30中に装填された（副通路29, 31を介して）ビーズ上に固定化されたプロテアーゼ酵素により消化される。流出液は、この段階で、廃物出口32に向けられるであろう。十分な反応時間後、緩衝液が配送され（溶離液入口28、緩衝液流し28 a、床25からの廃物）、床からのタンパク質消化物を次の捕捉区域35（堰6 eおよび6 fの間に形成された）中にフラッシュし、流出液は廃物出口39に送られる。

【0128】

第3の捕捉区域35は、固相抽出材料（副通路34, 36を介して充填され、除去される）を含有し、区域35内の床上に消化ペプチドを濃縮できる。次いで、メタノール／水性混合物またはアセトニトリル／水性混合物のような溶離溶媒が導入されて（溶離液入口33、緩衝液流し33 a）、濃縮されたタンパク質消化物を最終分析のためにチップ上の別に位置に送る（出口通路37、廃物39、または採集40）。

【0129】

充填床チップからエレクトロスプレー質量分析器へのインターフェース

本発明による充填床流動通路は、図10に示したように、エレクトロスプレーカブラ41を介して、質量分析器にインターフェースで連結してもよい。充填床4は、質量分析器内にエレクトロスプレーにより導入する前に、タンパク質の酵素

消化、特定の化学物質またはタンパク質のアフィニティー精製および予備濃縮、固相抽出の濃度強化、またはキャピラリー電気クロマトグラフィー分離、もしくはこれらや他の段階の任意の組合せを行ってもよい。チップからエレクトロスプレーへのインターフェースは、連結領域で、100 nm未満の死空間、好ましくは、1 nm未満、最も好ましくは、100 pm未満の死空間を提供する任意の方法を用いて行ってもよい。Wang等、またはKargerにより記載されている方法のような方法を用いて、そのインターフェースを形成することができる [Bings, N. H.; Wang, C.; Skinner, C. D.; Colyer, C. L.; Thibeault, P.; Harrison, D. J. Anal. Chem. 71 (1999) 3292-3296. Zhang, B.; Liu, H.; Karger, B. L.; Foret, F. Anal. Chem. 71 (1999) 3258-3264]。

【0130】

本発明を様々な実施の形態を参照して説明してきたが、請求項に記載された本発明の忠実な精神および範囲から逸脱せずに、明白な変更を行ったり、同等物で置き換えてもよいことが理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【図1A】

本発明による微小流動デバイスの平面図

【図1B】

充填材料（ビーズのような）が捕捉されているチャンバの拡大斜視図

【図2A】

チャンバ中に充填され、カバープレートにより保持されている充填材料（ビーズ）と共に、図1Bの線A-Aでとられたチャンバを示す断面図

【図2B】

本発明による堰の別の実施の形態の側面図

【図2C】

図2の端部図

【図3A】

図1Bおよび2Aに示したチャンバ中に充填されている充填材料（ビーズ）の初期段階の概略図

【図3B】

充填材料（ビーズ）が完全に充填された後の図3Aのチャンバの概略図

【図4A】

頂部近くの堰／ビーズ界面で1.0nMのBODIPY溶液の予備濃縮の初期段階を示す概略図

【図4B】

頂部近くの堰／ビーズ界面で1.0nMのBODIPY溶液の予備濃縮の後期段階を示す概略図

【図5】

充填中の第1の1.0nMのBODIPY試料、その後の緩衝液によるフラッシュ、およびアセトニトリル（ACN）による溶離中の予備濃縮されたBODIPYの蛍光を示す、蛍光強度対時間のプロットを示すグラフ

【図6】

充填、フラッシュおよび溶離を含む分離の異なる段階を示す、BODIPYおよびフルオレセインの電気クロマトグラムを示すグラフ

【図7】

特に、(A)30%、(B)22%、(C)15%および(D)10%での、移動相中の異なる濃度のアセトニトリルによるBODIPYおよびフルオレセインの電気クロマトグラムを示すグラフ

【図8】

本発明による微小流体デバイスの代わりの実施の形態の平面図

【図9】

多数の充填チャンバを有する、本発明による微小流体デバイスの平面図

【図10】

質量分析計と共に用いられている、本発明による微小流体デバイスの斜視図

【図11】

充填床を飽和しているときの、テオフィリンの蛍光強度対時間をプロットしているグラフ

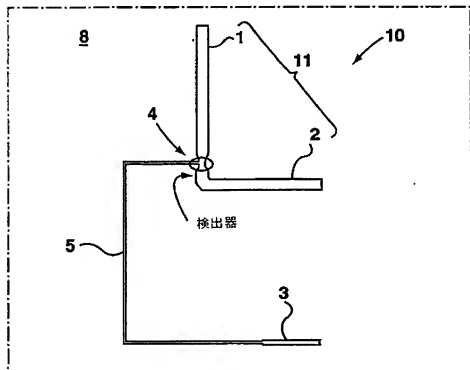
【図12】

比較的狭い帯域にある充填床から溶離されているテオフィリンを示すグラフ

【図13】

CL反応から発せられたより低い光となる各々の連続試行を示すグラフ

【図1A】



【図1B】

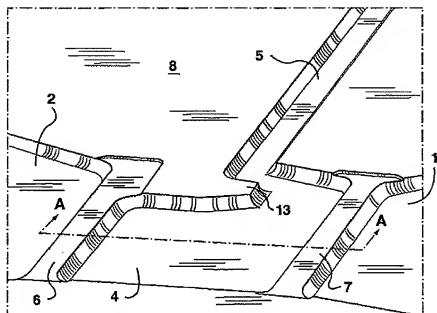
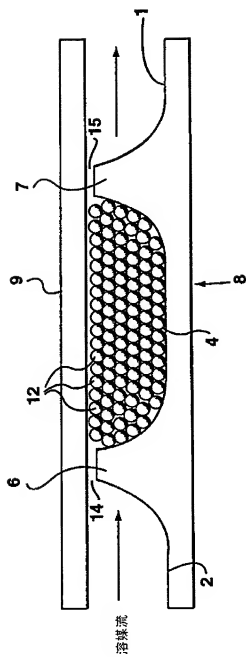
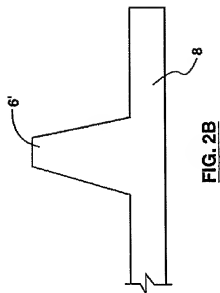


FIG. 1B

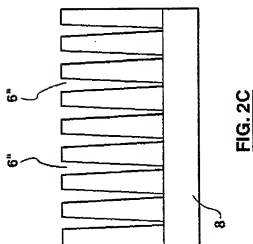
【図2A】



【図2B】



【図2C】



【図3A】

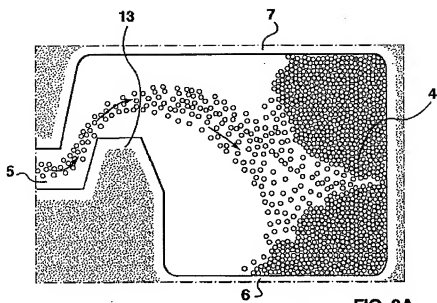


FIG. 3A

【図3B】

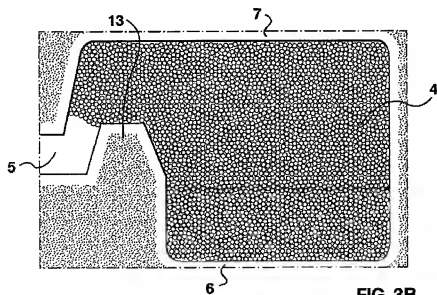


FIG. 3B

【図4A】

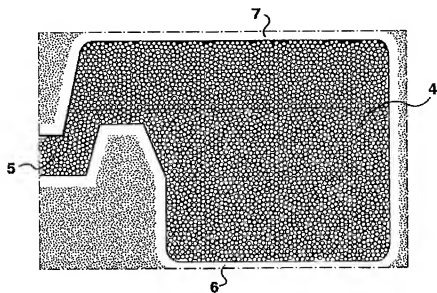


FIG. 4A

【図4B】

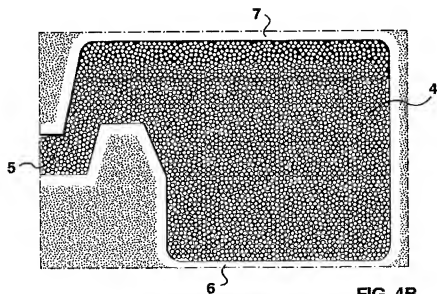
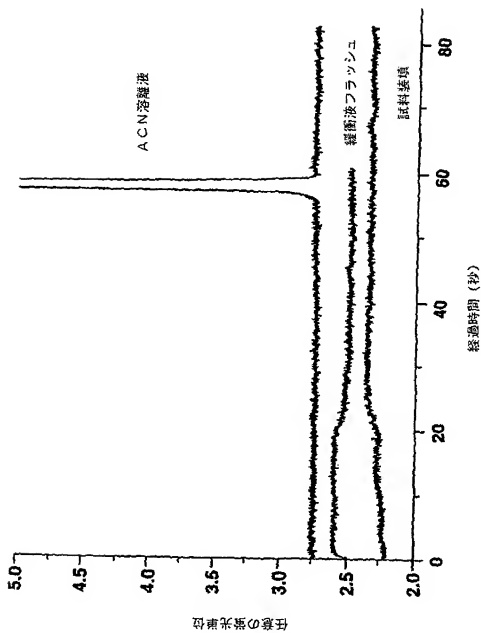
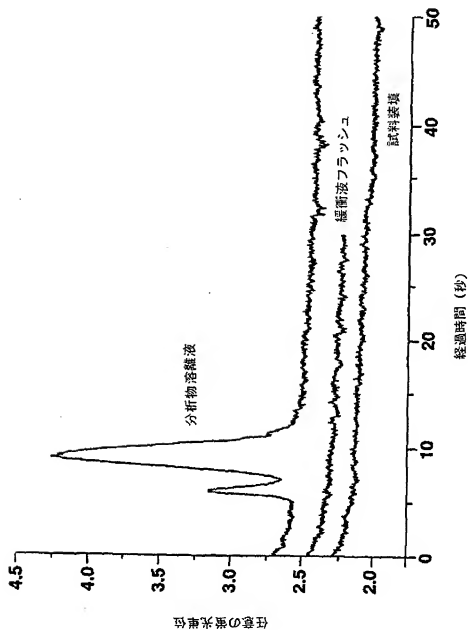


FIG. 4B

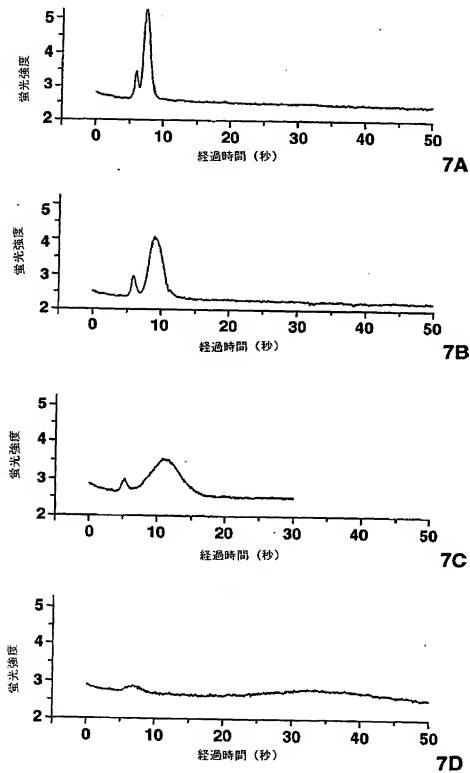
【図5】



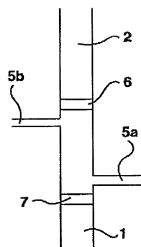
【図6】



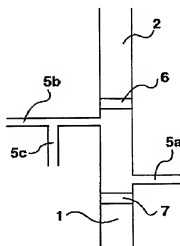
【図7】



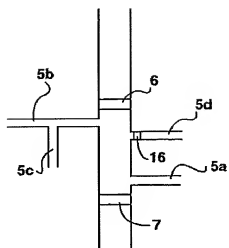
【図8A】

**FIG. 8A**

【図8B】

**FIG. 8B**

【図8C】

FIG. 8C

【図9】

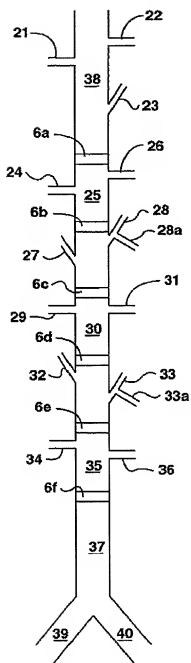
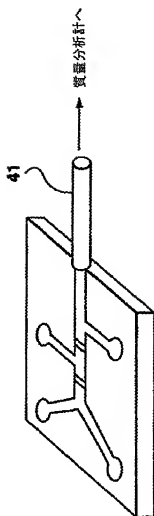
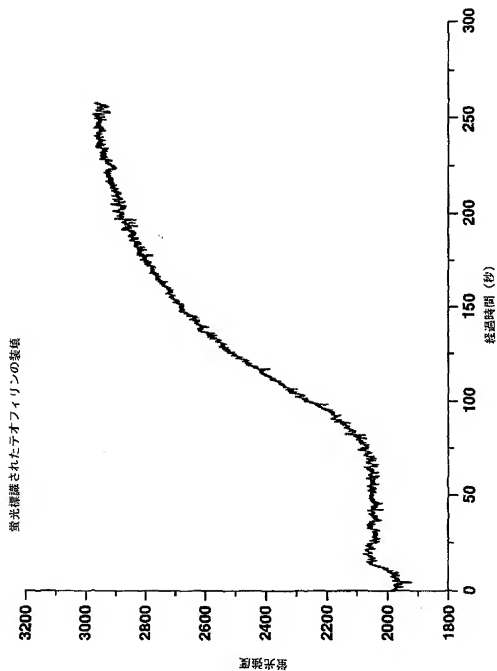


FIG. 9

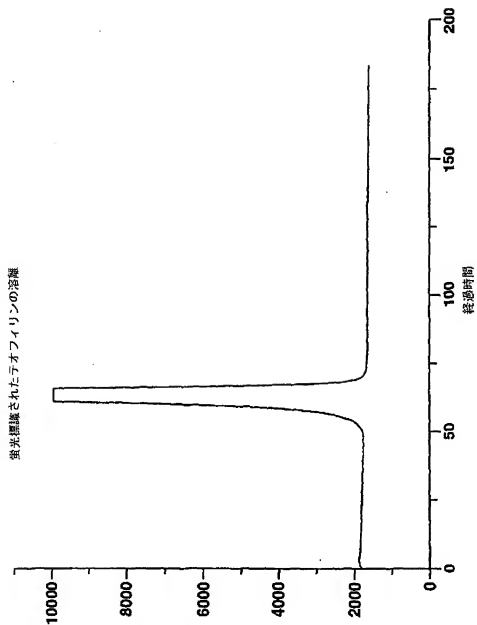
【図10】



【図11】

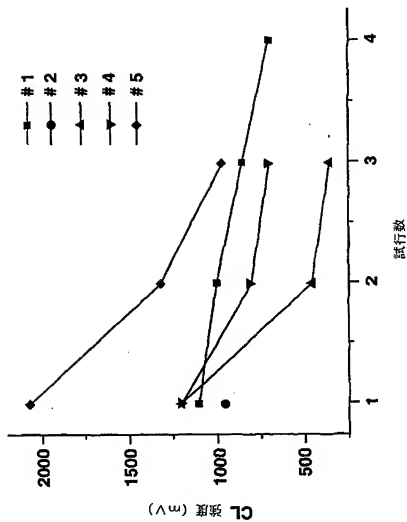


【図12】



【図13】

固定化HRPを用いた連続試行によるCCLの減少



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/CA 00/01421
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N27/447 601N1/40 601N30/56		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601N 801J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base used, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 40174 A (ACLARA BIOSCIENCES INC) 12 August 1999 (1999-08-12) page 4, line 5 - page 5, line 33 page 8, line 17-22 page 24, line 38-41	1, 12, 13
A	---	17
Y	US 5 453 163 A (YAN CHAO) 26 September 1995 (1995-09-26) cited in the application column 3, line 2 - column 5, line 23; figure 1	1, 12, 13
A	---	4, 5, 16
	---	-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "C" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (see specification) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 March 2001		Date of mailing of the international search report 05/04/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 6816 Patentamt 2 TL - 5280-H Fribourg Tel. (+31-70) 340-3040, Tx. 31 651 up to M, Fax (+31-70) 340-3018		Authorized officer Brison, O

Form PCT/ISA/210 (second sheet) July 1992

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. Appl. No.
PCT/CA 00/01421

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WRIGHT P B ET AL.: "BEHAVIOR AND USE OF NONAQUEOUS MEDIA WITHOUT SUPPORTING ELECTROLYTE IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY" ANALYTICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS, vol. 69, no. 16, 15 August 1997 (1997-08-15), pages 3251-3259, XP000699506 ISSN: 0003-2700 cited in the application abstract page 3253, right-hand column</p>	1,7
A	<p>EP 0 459 241 A (MILLIPORE CORP) 4 December 1991 (1991-12-04) column 2, line 26 -column 3, line 41 column 5, line 35 -column 9, line 32</p>	1
A	<p>WO 96 04547 A (LOCKHEED MARTIN ENERGY SYS INC - RAMSEY J MICHAEL (US)) 15 February 1996 (1996-02-15) page 8, line 3 -page 11, line 8 page 24, line 8-33</p>	1,17
X,P	<p>CHIEN N ET AL.: "Room temperature bonding of micromachined glass devices for capillary electrophoresis" SENSORS AND ACTUATORS B, CH, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, vol. 63, no. 3, May 2000 (2000-05), pages 147-152, XP004198333 ISSN: 0925-4005 the whole document</p>	17
A,P	<p>C. ERICSON ET AL.: ANALYTICAL CHEMISTRY., vol. 72, no. 1, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 81-87, XP002163649 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, COLUMBUS., US ISSN: 0003-2700 cited in the application page 81</p>	1,16
A	<p>US 5 908 552 A (ZIMMERMANN HANS-PETER ET AL) 1 June 1999 (1999-06-01) column 1, line 44-58; figure 1 column 4, line 16-33</p>	1,16

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.
PCT/CA 00/01421

D.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEIFAR R M ET AL: "Capillary electrochromatography with 1.8- μ m 005-modified porous silica particles" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A, NL, ELSEVIER SCIENCE, vol. 808, no. 1-2, 29 May 1998 (1998-05-29), pages 71-77. XP004122660 ISSN: 0021-9673 page 72 -page 73	1
A	CHIEH N H ET AL: "MICROCHIP SYSTEMS FOR IMMUNOASSAY: AN INTEGRATED IMMUNOREACTOR WITH ELECTROPHORETIC SEPARATION FOR SERUM THEOPHYLLINE DETERMINATION" CLINICAL CHEMISTRY, AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WINSTON, US, vol. 44, no. 3, 1998, pages 591-598, XP000937658 ISSN: 0009-9147 page 591 -page 592	17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

* Information on patent family members

Int. Appl. No.
PCT/CA 00/01421

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9940174 A	12-08-1999	US 6074827 A AU 2488799 A EP 1053298 A	13-06-2000 23-08-1999 22-11-2000
US 5453163 A	26-09-1995	NONE	
EP 0459241 A	04-12-1991	DE 69104775 D DE 69104775 T JP 4231863 A US 5348658 A US 5246577 A	01-12-1994 01-06-1995 20-08-1992 20-09-1994 21-09-1993
WO 9604547 A	15-02-1996	US 6001229 A AU 701348 B AU 3150895 A CA 2196429 A CN 1168720 A,B EP 0775306 A JP 10507516 T US 6010607 A US 6010608 A US 6033546 A US 5858195 A	14-12-1999 28-01-1999 04-03-1996 15-02-1996 24-12-1997 28-05-1997 21-07-1998 04-01-2000 04-01-2000 07-03-2000 12-01-1999
US 5908552 A	01-06-1999	EP 0779512 A	18-06-1997

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 オーレスチュック, リチャード
カナダ国 ティー6イー 1 ヴィー3 アルバータ州 エドモントン アヴェニュー
10520-80 アパートメント 001

(72)発明者 シュルツローックイヤー, ローラネル
アメリカ合衆国 コロラド州 81301 デュランゴ ウェストウッド プレイス 60
アパートメント エイ8

(72)発明者 スキナー, キャメロン
カナダ国 エイチ3エックス 2アール8
ケベック州 モントリオール クランラノールド 4635 アパートメント 201

(72)発明者 リ, ボール
カナダ国 ヴィー3ジェイ 1イー4 プリティッシュコロンビア州 バーナビー
マウントヴェュー プレイス 2659

Fターム(参考) 2G042 AA01 CB03 HA02 HA03 HA10
2G052 AD26 AD46 DA09 DA21 ED01
ED03 ED11 GA11 GA24 JA11
2G058 AA09 DA07 GA06

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
31 May 2001 (31.05.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/38865 A1

- (51) International Patent Classification⁷: G01N 27/447, 1/40, 30/56 2659 Mountview Place, Burnaby, British Columbia V3J 1B4 (CA).
- (21) International Application Number: PCT/CA00/01421 (74) Agent: BERESKIN & PARR; 40 King Street West, 40th Floor, Toronto, Ontario M5H 3Y2 (CA).
- (22) International Filing Date: 27 November 2000 (27.11.2000) (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 2,290,731 26 November 1999 (26.11.1999) CA (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE GOVERNORS OF THE UNIVERSITY OF ALBERTA [CA/CA]; 222 Campus Towers, 8625 - 112 Street, Edmonton, Alberta T6G 2E1 (CA).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): HARRISON, D., Jed [CA/CA]; 407 Rooney Crescent, Edmonton, Alberta T6R 1C5 (CA); OLESCHUK, Richard [CA/CA]; 10520-80 Avenue, Apt. 001, Edmonton, Alberta T6E 1V3 (CA); SHULTZ-LOCKYEAR, Loranelle [US/US]; 60 Westwood Place, Apt. A8, Durango, CO 81301 (US); SKINNER, Cameron [CA/CA]; 4635 Clairanal, Apt. 201, Montreal, Quebec H3X 2R8 (CA); LI, Paul [CA/CA].
- Published:
— With international search report.
— Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments.
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/38865 A1

(54) Title: APPARATUS AND METHOD FOR TRAPPING BEAD BASED REAGENTS WITHIN MICROFLUIDIC ANALYSIS SYSTEMS

(57) Abstract: The present invention provides an on-chip packed reactor bed design that allows for an effective exchange of packing materials such as beads at a miniaturized level. In accordance with the present invention, there is provided a method of concentrating an analyte within a microfluidic analysis system, comprising the steps of: a) providing a main channel having a trapping zone suitable for trapping packing material; b) providing a slurry of a reagent treated packing material prepared in a solution having a predetermined composition of a solvent; c) inducing a flow of said packing material into said trapping zone through a flow channel connected to said trapping zone so as to load said trapping zone and form a packed bed of said packing material; d) and flowing a sample containing analytes through said packed bed, said reagent acting to concentrate at least some of said analytes within said trapping zone. The present invention extends the function of microfluidic analysis systems to new applications including on-chip solid phase extraction (SPE) and on-chip capillary electrochromatography (CEC). The design can be further extended to include integrated packed bed immuno- or enzyme reactors.

- 1 -

**Title: Apparatus and Method for Trapping Bead Based Reagents
Within Microfluidic Analysis Systems**

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates generally to microfluidic
5 analysis systems, and more specifically to micro-Total Analysis Systems (μ -TAS), for performing liquid phase analysis at a miniaturized level.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Recent developments in the field of micro-Total Analysis
Systems (μ -TAS) have led to systems that perform chemical reactions,
10 separation and detection at a miniaturized level on a single microchip [see, for example, Harrison, D. J.; Fluri, K.; Seiler, K.; Fan, Z.; Effenhauser, C. S.; and Manz, A., *Science* 1993, 261, 895-897. Harrison, D.J.; and van den Berg, E.; Eds., *Micro Total Analysis Systems '98, Proceedings of the μ TAS '98 Workshop* (Kluwer: Dordrecht, 1998). Coyler, C. L.; Tang, T.; Chiem,
15 N.; and Harrison, D. J., *Electrophoresis* 1997, 18, 1733-1741].

Most prior art microfluidic devices are based on conventional open tubular flow designs and solution phase reagents. While the functionality of these devices has continued to increase, one key feature that is presently lacking in these prior art devices is the ability to
20 effectively incorporate on-chip packed reactor beds, for introduction of packing materials with immobilized reagents or stationary phases. While a few attempts have been made to employ packed reactor beds in some prior art designs, the difficulty of packing portions of a complex microfluidic manifold with packing material (such as microscopic beads)
25 has so far hindered the effective utilization of these reagent delivery vehicles within microfluidic devices. (The difficulty of packing has been well recognized by practitioners in the field. See, for example, Ericson, C; Holm, J.; Ericson, T.; and Hjertén, S., *Analytical Chemistry*.)

In one prior art example, a packed bed chromatographic
30 device with a bead trapping frit was fabricated in a silicon substrate [Ocvirk,

G., Verpoorte, E., Manz, A., Grasserbauer, M., and Widmer, H. M. *Analytical Methods and Instrumentation* 1995, 2, 74-82]. However, the packing material in this prior art design could not be readily packed or exchanged, thus limiting its utility.

5 Several authors have also described the difficulties associated with reproducibly fabricating frits for retaining packing material in conventional capillaries [Boughtflower, R.J.; Underwood, T.; Paterson, C. J. *Chromatographia* 1995, 40, 329-335. Van den Bosch, S. E.; Heemstra, S.; Kraak, J. C.; Poppe, H. J. *Chromatogr. A* 1996, 755, 165-177. Colon, L. A.; Reynolds, K. J.; Alicea-Maldonado, R.; Fermier, A. M. *Electrophoresis* 1997, 18, 2162-2174. Majors, R. E. *LC-GC* 1998, 16, 96-110.]. The frits used in
10 conventional systems are prepared using time and labor intensive procedures, the most commonly used method involving the use of pure silica gel, wetted down with aqueous sodium silicate. The frit is made by
15 first tapping a capillary end into a paste made from silica and aqueous sodium silicate. The resulting plug of silica is then heated to make a frit. Current construction methods do not produce high yields of useable frits.

Furthermore, using frits produced by prior art methods of construction often leads to the formation of undesirable bubbles. [Altria, K.D.; Smith, N.W.; and Turnbull, C.H., *Chromatographia*, 46 (1997) 664. Majors, R.E., *LC-GC*, 16 (1998) 96.] Bubbles cause discontinuity within a column, hindering solution flow and ultimately preventing separation from occurring. The bubbles are thought to arise from a change in electroosmotic flow (EOF) velocity caused by moving from a bead trapping
25 frit into an open capillary. The formation of bubbles, which have been observed to increase at higher voltages, also limits the amount of voltage that can be applied across the capillary, thereby limiting column length, separation efficiency, and speed of analysis.

Developing a functional on-chip packed reactor bed design
30 which overcomes the limitations in the prior art would significantly enhance the range of the microfluidic toolbox and extend the number of applications of such devices.

SUMMARY OF THE INVENTION

Generally, the present invention provides an on-chip packed reactor bed design using one or more weir structures that allow for an effective exchange of packing materials (beads for example) at a miniaturized level. The present invention extends the function of microfluidic analysis systems to new applications. For example, the packed reactor bed formed according to the present invention allows on-chip solid phase extraction (SPE) and on-chip capillary electrochromatography (CEC), as explained in detail further below. The design can be further extended to include, for example, integrated packed bed immuno- or enzyme reactors.

In a first aspect, the present invention provides a method of treating a sample within a microfluidic analysis system, comprising the steps of:

- a) providing a main channel having a trapping zone suitable for trapping packing material;
- b) providing a slurry of a reagent treated packing material prepared in a solution having a predetermined composition of a solvent;
- c) inducing a flow of said packing material into said trapping zone through a flow channel connected to said trapping zone so as to load said trapping zone and form a packed bed of said packing material;
- d) flowing a sample containing analytes through said packed bed, said reagent treating the sample, whereby the sample leaving the trapping zone has an altered analyte composition.

In one embodiment, the method further comprises the step of:

- e) adjusting the composition of the solvent, so as to affect the aggregation of said packing material and the stabilization of the packed bed.

In another embodiment, step b) comprises providing packing

In another embodiment, said porous beads are selected to have a diameter in the range from about 0.7 to about 10.0 μm .

In yet another embodiment, said porous beads are selected to have a diameter in the range from about 1.5 to about 4.0 μm .

5 In another embodiment, said solvent is acetonitrile, and step e) comprises adjusting the concentration level to less than about 50% to stabilize the packed bed.

In another embodiment, said solvent is acetonitrile, and step e) comprises adjusting the concentration level to less than about 30% to
10 stabilize the packed bed.

In another embodiment, the method further includes the steps of adjusting the concentration level to above 50% to destabilize the packed bed, and reversing the flow in step c) so as to unload said trapping zone.

In another embodiment, the method further includes the step
15 of repeating step c) so as to reload said trapping zone, and readjusting the concentration level to restabilize the packed bed.

In yet another embodiment, the method further comprises the steps of:

before step c), adding a neutral surfactant to said packing
20 material so as to inhibit aggregation; and
after step c), removing the neutral surfactant to promote aggregation.

In another embodiment, the method further comprising the steps of:

25 after step c) introducing a polymerizable agent into the flow channel and polymerizing said agent, so as to stabilize the packed bed.

In yet another embodiment, step d) comprises applying a fluid force to induce the flow of said packing material.

30 In another embodiment, said packing material comprises at least some electrically charged particles and step d) comprises applying a voltage potential to induce the flow of said packing material.

In another embodiment, said packing material comprises at least some particles susceptible to a magnetic field and step d) comprises applying a magnetic field to induce the flow of said packing material.

In another embodiment, the method further includes the step
5 of providing a hook structure at the connection point between said flow channel and said trapping zone, so as to prevent direct line-of-sight entry of said packing material, thereby to promote even packing.

In another aspect, the present invention provides a method of trapping bead based reagents within a microfluidic analysis system,
10 comprising the steps of:

- a) providing a main channel having a trapping zone suitable for trapping bead based packing material;
- b) providing a slurry of a reagent treated beads prepared in a solution having a predetermined composition of a solvent;
15
- c) inducing a flow of said beads into said trapping zone through a flow channel connected to said trapping zone so as to load said trapping zone and form a packed bed of said beads; and
- 20 d) adjusting the composition of the solvent, so as to affect the aggregation of said packing material and the stabilization of the packed bed.

In a further aspect, the present invention provides a microfluidic analysis system, comprising:

- 25 a) a substantially planar substrate having an upper surface;
- b) at least one main channel formed into said upper surface, said main channel having first and second ends and a defined direction of flow in use;
- c) a cover plate arranged over said planar substrate, said
30 cover plate closing off said channel from above; and
- d) a first weir formed across said main channel and between said first and second ends of said channel, said first weir

providing at least one flow gap to allow, in use, at least some fluid to flow past said first weir while trapping packing material having constituent particles that are generally larger than said flow gap.

5 In one embodiment, the system further comprises at least one side channel formed into the upper surface of said planar substrate, said side channel being connected at a first end to said main channel at a location upstream from said first weir, and at a second end to a reservoir, said side channel providing a higher flow resistance than said main
10 channel.

In another embodiment, the system further comprises a second weir located upstream from said connected first end of said side channel, said first and second weirs forming a chamber therebetween, said second weir providing at least one flow gap to allow, in use, at least some fluid to
15 flow past said second weir while trapping said packing material within said chamber.

In another embodiment, each side channel connection to said main channel is provided with a hook structure curved to one side whereby, in use, packing material is sprayed into said chamber to facilitate
20 even packing.

In another embodiment, said hook structure at least partially obstructs direct line-of-sight entry of packing material from said side channel into said chamber and forms a chamber mouth to one side of said hook structure.

25 In another embodiment, said flow gaps comprise a generally uniform gap between said cover plate and the top of said weirs.

In yet another embodiment, said flow gaps comprise a plurality of substantially vertical gaps in said weirs.

In another embodiment, said system is formed entirely on a
30 single microfluidic chip.

In another embodiment, the present invention provides a method comprising, providing a non-conductive substrate and effecting

- 7 -

an electrokinetic flow by applying a relatively high voltage at said second end of said main channel and at said reservoir, said reservoir containing packing material, and providing a relatively low voltage at said first end of said main channel, so that packing material flows from said reservoir into
5 said main channel and is trapped against said first weir.

In one embodiment, the packing material is removed from said main channel by providing a relatively high voltage at said first and second ends of said main channel while providing a relatively low voltage at said reservoir.

10 In another aspect, the present invention provides a method comprising, effecting a pressure driven flow by providing a relatively high pressure at said second end of said main channel and at said reservoir, said reservoir containing packing material, and providing a relatively low pressure at said first end of said main channel, so that packing material
15 flows from said reservoir into said main channel and is trapped against said first weir.

In one embodiment, the packing material is removed from the said main channel by providing relatively high pressure at said first and second ends of said main channel while providing relatively low pressure
20 at said reservoir.

In another embodiment, the method comprises providing a non-conductive substrate and effecting an electrokinetic flow by applying a relatively high voltage at said reservoir, said reservoir containing packing material, and providing relatively low voltages at said first and second
25 ends of said main channel, so that packing material flows from said reservoir into said chamber and is trapped by said first and second weirs.

In another embodiment, the packing material is removed from the chamber by reversing said electrokinetic flow.

30 In another aspect, the present invention provides a method of packing the chamber in a microfluidic analysis system comprising, effecting a pressure driven flow by providing a relatively high pressure at said reservoir, said reservoir containing packing material, and providing

relatively low pressure at said first and second main reservoirs, whereby, packing material flows from said packing material reservoir into said chamber and is trapped by said first and second weirs.

In another embodiment, the packing material may be removed
5 from the chamber by reversing said pressure driven flow.

In another embodiment, the method comprises providing magnetically charged packing material, and effecting a magnetically driven flow by providing a magnetically attractive force in the chamber, whereby, the packing material enters the chamber and is trapped by said first and
10 second weirs.

In another embodiment, the packing material may be removed from the chamber by reversing said magnetic force in said chamber.

In any of the above embodiments, the packing material may comprise porous beads.

In another embodiment, the beads may be generally spheroid.
15

In another embodiment, the beads are initially suspended in a buffer solution.

In another embodiment, the buffer solution is an organic solvent miscible with water.

In another embodiment, the organic solvent is acetonitrile with a concentration level of up to 50%.
20

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

For a better understanding of the present invention, and by
25 way of example, reference will now be made to the accompanying drawings, which show preferred embodiments of the present invention in which:

Figure 1A shows a top plan view of a microfluidic device according to the present invention;

30 Figure 1B shows an enlarged perspective view of a chamber in which packing materials (such as beads) are trapped;

Figure 2A shows a cross-sectional view of the chamber shown

in Figure 1B taken along line A-A, and further shows packing material (beads) which are packed into the chamber and which are retained by a cover plate;

Figures 2B and 2C show a side view and end view, respectively, of an alternative embodiment of a weir according to the present invention;

Figure 3A shows an initial stage of packing material (beads) being packed into the chamber shown in Figures 1B and 2A;

Figure 3B shows the chamber of Figure 3A after it has been completely filled with packing material (beads);

Figure 4A shows an early stage of preconcentration of a 1.0 nM BODIPY solution at the weir/bed interface near the top of Figure 4A;

Figure 4B shows a later stage of preconcentration of a 1.0 nM BODIPY solution at the weir/bed interface near the top of Figure 4B;

Figure 5 shows a plot of fluorescence intensity vs. time, showing fluorescence of a first 1.0 nM BODIPY sample during loading, followed by a buffer flush, and then preconcentrated BODIPY during elution with acetonitrile (ACN);

Figure 6 shows an electrochromatogram of BODIPY and fluorescein, showing different steps of the separation including load, flush, and elution;

Figures 7A-7D show electrochromatograms of BODIPY and fluorescein with different concentrations of acetonitrile in the mobile phase, specifically at: (a) 30%; (b) 22%; (c) 15%; and (d) 10%;

Figures 8A-8C show top plan views of alternative embodiments of a microfluidic device according to the present invention;

Figure 9 shows a top plan view of a microfluidic device according to the present invention having multiple packed chambers;

Figure 10 shows a schematic view of a microfluidic device according to the present invention being used in conjunction with a mass spectrometer;

Figure 11 shows a graph plotting the fluorescence intensity of

- 10 -

theophylline against time, as it saturates a packed bed;

Figure 12 shows theophylline being eluted from packed bed in a relatively narrow band; and

Figure 13 shows each successive trial resulting in lower light
5 generated from the CL reaction.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

As explained above, the present invention is designed to provide a convenient system and method of trapping packing materials (such as beads) on-chip, and of effectively packing and unpacking the trapping zones, to provide a functional on-chip packed reactor bed which
10 significantly extends the number of applications of microfluidic analysis devices.

One such extended application facilitated by the present invention is on-chip sample preconcentration by solid phase extraction (SPE). In microfluidic analysis, SPE is often required to overcome
15 detection limit problems, or to eliminate a potential interferent. To date, preconcentration within microchips has been performed by sample stacking using "isoelectric focusing" [Jacobson, S. C. and Ramsey, M. *Electrophoresis* 1995, 16, 481-486]. Advantageously, unlike sample
20 stacking, SPE can be made selective for a particular analyte and does not require precise control of buffer concentrations. For SPE the amount of preconcentration is limited by the preconcentration time, which makes it more flexible than sample stacking. The SPE of an analyte can be beneficial not only for analyte preconcentration, but also for removing other
25 impurities or changing solvent conditions. While the coupling of SPE with microfluidic devices has been accomplished [Figeys, D. and Aebersold, R. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3721-3727], the SPE component in these prior art devices have been made in a capillary or similar cartridge external to the chip, thus resulting in a more complex and more expensive
30 system. The present invention is designed to overcome this prior art limitation by facilitating an on-chip SPE component.

As realized by the present inventors, an integrated, on-chip SPE component is ultimately easier to manufacture, does not require low dead volume coupling to the chip, and eliminates sample handling losses or contamination problems arising from the off-chip sample manipulation required in the prior art. It is anticipated that routine incorporation of SPE onto a chip, as facilitated by the present invention, will reduce problems with on-chip detection limits and will improve the range of sample preparation steps which can be integrated.

Another extended application facilitated by the present invention is on-chip capillary electrochromatography (CEC). CEC has recently received significant attention due to the fact that it combines the separation power of both liquid chromatography and capillary electrophoresis. To date the difficulty associated with packing chromatographic material within devices has focused most previous chromatographic efforts upon prior art open channel methods [Manz, A., Miyahara, Y., Miura, J., Watanabe, Y., Miyagi and H. Sato, K., *Sens. Actuators* 1990, B1, 249-255; Jacobson, S. C., Hergenröder, R., Koutny, L. B. and Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* 1994, 66, 2369-2373; Kutter, J. P., Jacobson, S. C., Matsubara, N. and Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3291-3297; He, B., Tait, N. and Regnier, F. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3790-3797]. In the prior art, open channel method devices with channel widths of 2 μ m or less were required to improve mobile-phase transfer in open columns leading to other practical considerations such as clogging and a short path length for detection. There were also problems with the reproducibility and the cost of stationary phase coating in such structures.

As realized by the inventors, on-chip packed bed chromatography according to the present invention has the benefit of providing low mobile-phase mass transfer, and makes available a wide variety of stationary phases. In this case, the use of an off-chip prepared stationary phase offers the advantage that it eliminates the need for coating the chip and allows for optimization of the stationary phase preparation.

Yet another extended application facilitated by the present invention is providing on-chip bead-based immunoassay and enzyme based assays. These applications are described further below.

EXAMPLE

- 5 To illustrate the present invention by way of example, the inventors conducted a series of experiments, which are described here.

Chip Design

- Figures 1A and 1B show a microfluidic device 10 as used in these experiments. The device 10 comprises a main channel 11 formed into the top surface of a substrate 8, and the main channel 11 is separated by a chamber 4, also formed into the substrate 8. Two branches of the main channel 11, as separated by the chamber 4, are further identified as main reservoirs 1 and 2. The chamber 4 is connected to a packing material reservoir 3 by a narrow side channel 5. The packing material reservoir and the narrow side channel 5 are also formed into the substrate 8. Figure 1B shows an enlarged image of the chamber 4 obtained with a scanning electron microscope (Jeol X-Vision JSM6301FXV, Peabody, MA). The chamber 4 is formed by providing two weirs 6, 7 formed across the main channel 11 at a relatively narrow portion of the main channel 11 (Figure 1A). As can be seen from Figure 1B, the weirs 6, 7 are not as high as the main channel 11 is deep, so that some fluid is allowed to flow over the weirs 6, 7 as explained below. The device 10 was prepared in Corning 0211 glass by the Alberta Microelectronic Corporation (Edmonton, AB), using known chemical etching procedures [Fan, Z. H.; Harrison, D. J. *Anal. Chem.* 1994, 66, 177-184]. It is noted that this substrate material is non-conductive, but if other than electrokinetic forces are being used (as detailed further below), then the substrate material may be semiconducting or conducting. Two photomasks were required to create device 10: a first photomask was used to etch the tops of the weirs 6, 7 to a depth of approximately 1 μm ; and a second photomask was used to etch

- 13 -

the channels 5, 11 to a depth of approximately 10 μm .

Figure 2A shows a cross-sectional view of the weirs 6, 7 which are not as high as the channel 11 (main reservoirs 1, 2) is deep, and thus small flow gaps 14, 15 are provided between the top of the weirs 6, 7 and a cover plate 9 (not shown in Figure 1A or 1B) which is placed on top of the substrate 8, thereby closing off the chamber 4, channels 5, 11 and reservoirs 1, 2, 3. As can be seen in Figure 2A, the beads 12 are generally larger than the flow gaps 14, 15 and therefore cannot escape from the chamber 4.

Figures 2B and 2C show a side view and an end view, respectively, of an alternative embodiment of a weir 6' in which substantially vertical notches 6'' are provided so that the weir 6' provides less flow impedance. The vertical notches 6'' should be narrow enough that no beads can pass through them (i.e. they should be at least about 10% smaller than the smallest bead diameter).

15 Solutions and Reagents

Various solutions and reagents were used in these experiments. Acetonitrile (BDH, Toronto, ON) was filtered through a 0.45 μm Nylon-6,6 filter (Altech, Deerfield, IL) prior to use. Otherwise, the acetonitrile was used as received, with no added electrolyte. Also, 50 mM potassium phosphate (pH 7.0) and ammonium acetate (pH 8.5) buffers were prepared in ultra-pure water (Millipore Canada, Mississauga, ON). A 1:1 (v/v) mixture of acetonitrile and buffer was prepared. A stock solution of 0.10 mM, 4,4'-difluoro 1,3,5,7,8 penta methyl -4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene, BODIPY 493/503 (Molecular Probes, Eugene, OR) was prepared in HPLC grade methanol (Fisher, Fair Lawn, NJ). A 1 mM stock solution of fluorescein di-sodium salt (Sigma) was prepared in phosphate buffer. Both stock solutions were then diluted in the 50 mM phosphate and 50 mM ammonium acetate buffers to give 1.0 μM solutions, which were then diluted to 1.0 nM. This 1.0 nM solution served as the sample for preconcentration and electrochromatography. All aqueous (buffer and sample) solutions were filtered through a cellulose

- 14 -

acetate syringe filter (0.2 μm pore size) (Nalgene, Rochester, NY) prior to use.

Packing Material

One suitable packing material used in these experiments
5 comprised a reverse-phase chromatographic stationary resin. The resin was Spherisorb ODS1 (Phase Separations, Flintshire, UK), a porous C-18 resin whose particles ranged from 1.5 to 4.0 μm in diameter, as determined by scanning electron microscopy (ODS beads 12). A slurry of approximately 0.003 g/mL of ODS1 was prepared in acetonitrile. This slurry was used to
10 supply the packing material reservoir 3, to subsequently pack the chamber 4.

Certain solvent and additive combinations were found to help the packing material stay in the packed chambers. For example, if ODS beads are introduced in acetonitrile they flow readily, while
15 subsequently switching to an aqueous or predominately aqueous solvent causes the beads to aggregate and become trapped within the chamber. With ODS beads up to 30% acetonitrile could be present in the aqueous solution without disrupting the aggregation observed to the point of destabilizing the packed bed. Up to 50% acetonitrile could be present with
20 only modest loss in aggregation and weak destabilization of the bed. As another example protein G or protein A coated beads formed aggregates in aqueous solution, which made it hard to introduce them into the trapping zone. However, the addition of a neutral surfactant such as Tween 20 or Brij 35 (both are trademarks) prevented such aggregation and allowed the
25 beads to be introduced. Conversely, subsequent removal of the surfactant from the aqueous solvent resulted in aggregation and enhanced stability of the trapped bed. The following trend was observed: when using non-polar or partially non-polar bead phases (for example, ODS and protein coated beads) lowering the surface tension of the solvent from that of water or
30 buffered water, by the addition of organic additives such as organic solvents or surfactants, reduced the tendency to aggregate. Conversely

- 15 -

- reducing or eliminating materials with lower surface tension from aqueous solution increased the tendency to lock the beads in place on the bed, creating a "solvent lock" method to enhance bead trapping within these devices. Other organic solvents other than acetonitrile, miscible with water may also be used for these purposes, such as methanol, ethanol, dimethylsulfoxide, propylene carbonate, etc. Charged surfactants may also be used instead of neutral surfactants, so long as they are compatible with the proteins that may be present on the beads or in the sample.
- 10 Magnetic beads used for magnetic packing may comprise Abebaw - protein "A" coated beads: composition 36-40% magnetite dispersed within a copolymer matrix consisting of styrene and divinyl benzene (Prozyme, California) Also, Guifeng - oligo (dT)₂₅ coated beads may be used for the isolation of mRNA. The beads have an even dispersion of magnetic material (Fe₂O₃ and Fe₃O₄) through out the bead. The beads are coated with a polystyrene which encases the magnetic material (Dynal, Oslo, Norway).
- 15

Instrumentation

- Various instruments were used in conducting the present experiments. As these instruments and their operation are well known to those skilled in the art, only a brief description is provided, and the instruments are not shown in the figures.
- 20

- A power supply and relay system used to control the electrophoretic voltages necessary for bead packing and all liquid handling on-chip has been described previously [Fluri, K., Fitzpatrick, G., Chiem, N. and Harrison, D.J. *Anal. Chem.* 1996, 68, 4285-4290]. LabVIEW programs (National Instruments, Austin, TX), were written for computer control of the voltage system and for data acquisition.
- 25

- A laser-induced fluorescence detection system used in this experiment consisted of a 488 nm argon ion laser (Uniphase, San Jose, CA), operated at 4.0 mW, and associated focusing optics [Manz, A., Miyahara, Y.,
- 30

- 16 -

Miura, J., Watanabe, Y., Miyagi, H. and Sato, K. *Sens. Actuators* 1990, B1, 249-255] (Melles Griot, Irvine, CA). Fluorescence emitted from the BODIPY sample (as described above) was collected by a 25X, 0.35 NA microscope objective (Leitz Wetzlar, Germany). The images were observed with a
5 SONY CCD-IRIS camera. Alternatively a 530 nm emission filter and a photo multiplier tube (PMT) (R1477, Hamamatsu, Bridgewater, NJ) were used as a detector positioned so that the narrow channel 5 between the chamber 4 and packing material reservoir 3 could be monitored. Data was collected from the section of main channel 11 just next to the chamber 4.
10 The weir 6 was just out of the field of view. The PMT was biased at 530 V while the PMT signal was amplified, filtered (25 Hz Butterworth) and sampled at a frequency of 50 Hz.

The fluorescence of the buffer, acetonitrile, and 1.0 nM BODIPY in both buffer and acetonitrile was measured using a Shimadzu
15 RF-5301PC Spectrofluorophotometer.

While specific models and manufacturers have been provided for various instrumentation described above, it will be understood by those skilled in the art that any suitable, functional equivalent may be used.

20 Chip Operation

Referring back to Figures 1A and 1B, the narrow side channel 5 leading into the chamber 4 from packing material reservoir 3 was used to direct stationary phase packing material into the chamber 4 using electrokinetic pumping [Yan, C., U. S. Patent 5 453 163, 1995; Knox, J. H.
25 and Grant, I. H. *Chromatographia* 1991, 32, 317-328]. As mentioned above, the substrate 8 is non-conductive, which allows packing of the beads 12 using the electrokinetic pumping method.

The device 10 was not conditioned with any aqueous solutions prior to use. The chamber 4, channels 5, 11, and reservoirs 1, 2, 3
30 were first filled with acetonitrile. The chamber 4 was packed with ODS beads 12 (Figure 2) by replacing the acetonitrile in packing material

- 17 -

reservoir 3 with the ODS/acetonitrile slurry (described above), then applying positive high voltage at packing material reservoir 3 while holding main reservoirs 1 and 2 at ground. The voltage applied at packing material reservoir 3 was ramped from 200 V to 800 V over approximately 5 min to effect packing of chamber 4.

Once the chamber 4 was packed, a step gradient was performed to introduce aqueous solution to the main channel 11 and the ODS beads 12 in the chamber 4. A 1:1 (v/v) mixture of acetonitrile and buffer was placed in reservoirs 1 and 2. Acetonitrile replaced the slurry in packing material reservoir 3. A voltage was then applied to main reservoir 1 and was ramped from 200 V to 800 V, with packing material reservoir 3 biased at 400 V and main reservoir 2 grounded. After 2 to 5 min at 800 V, the acetonitrile/buffer mixture in reservoirs 1 and 2 was replaced with buffer, and the same voltage program repeated. The chamber 4 was monitored visually to ensure that the acetonitrile was completely replaced by buffer and that the packing material (beads 12) did not shift or unpack during this procedure. (The beads 12 could be seen to agglomerate as the acetonitrile was expelled, and the index of refraction change at the water/acetonitrile interface was clearly visible.) The experiments conducted are described in further detail below.

Experimental Results and Discussion

In order to conduct the experiments, it was necessary to pack the chamber 4 with packing material (beads 12), as shown in Figure 2A.

The narrow side channel 5 shown in figures 1A and 1B was made to be about 30 μ m wide to supply packing material (beads 12) to the chamber 4. A sample could then be delivered from reservoir 2 (the inlet channel), across the chamber 4 and on towards main reservoir 1 (the outlet channel). The volume of the chamber 4 was 330 pL, while the volume of the outlet and inlet channels was 1.5×10^{-7} L and 4.1×10^{-8} L, respectively. The main channel 11 had much lower flow resistance than the side channel 5, in spite of the weirs 6, 7, given their relatively wide widths (580

μm , tapering to 300 μm at the weirs) in comparison to the width of the narrow channel 5 (30 μm). The relative flow resistance in the device 10 was manipulated by the selection of the width dimensions for these channels 5, 11 in order to encourage flow between main reservoirs 1 and 2, rather than into the narrow bead introduction side channel 5 during sample loading and elution.

Reverse phase ODS beads 12 (as described previously) were used in the SPE device because of their extensive use for the chromatography of proteins, peptides and tryptic digests [Seifar, R. M.; Kok, W. T.; Kraak, J. C.; and Poppe, H. *Chromatographia*, 1997, 46, 131-136. Yan, C.; Dadoo, R.; Zhao, H.; Zare, R. N.; and Rakestraw, D. J., *Anal. Chem.* 1995, 67, 2026-2029.] as well as other applications of SPE and CEC [Nielsen, R. G.; Riggins, R. M.; Rickard, E. C. *J. Chromatogr.* 1989, 480, 393-401. Hancock, W. S.; Chloupek, R. C.; Kirkland, J. J.; Snyder, L. R. *J. Chromatogr. A* 1994, 686, 31-43.]. Electrokinetic packing of conventional capillaries has been described previously, [Yan, C.; U. S. Patent 5 453 163, 1995. Knox, J. H.; Grant, I. H. *Chromatographia* 1991, 32, 317-328.], and the inventors have adapted the method for the present invention.

As briefly explained earlier, the packing procedure involved applying a positive voltage (ramped from 200-800 V) to the packing material reservoir 3, while grounding main reservoirs 1 and 2. The applied voltage induced EOF to flow down the bead channel, carrying the beads into the cavity. An organic solvent was required to suspend the chromatographic beads 12 to prevent them from aggregating and plugging the narrow side channel 5. Studies have shown that capillaries filled with acetonitrile exhibit substantial electroosmotic flow [Wright, P. B.; Lister, A. S.; Dorsey, J. G. *Anal. Chem.* 1997, 69, 3251-3259. Lister, A. S.; Dorsey, J. G.; Burton, D. E. *J. High Resol. Chromatogr.* 1997, 20, 523-528. Schwer, C.; Kenndler, E. *Anal. Chem.* 1991, 63, 1801-1807. Salimi-Moosavi, H.; Cassidy, R. M. *Anal. Chem.* 1995, 67, 1067-1073.].

As shown in Figure 3A, at the early stages of packing, the beads 12 entering the chamber 4 contacted the weirs 6, 7 on either side of

- 19 -

the chamber 4. As explained earlier, the beads 12 are unable to traverse the weirs 6, 7 because the distance from the top of the weirs 6, 7 to the bottom of the cover plate 9 (approximately $1.0\text{ }\mu\text{m}$) is less than the diameter of the individual particles of the ODS beads 12 (approximately $1.5 - 4.0\text{ }\mu\text{m}$).

5 As shown in Figure 3B, the chamber 4 continued to pack until it was entirely filled with chromatographic material. As discussed earlier, the difficulties associated with reproducibly fabricating frits for retaining packing material is well known. Importantly, the weir design used in the present invention circumvented this problem, and the
10 electrokinetic packing of the beads provided an even distribution of beads throughout the chamber with no observable voids. In fact, the use of weir structures may ultimately eliminate the need for on column frit fabrication.

The weir design of the present invention allows electric fields
15 to be applied across the trapping zone formed by two weirs, when filled with beads, in a range as high as $20,000$ to $80,000\text{ V/cm}$ without bubble formation at the weir. Separations performed in devices with these weirs can use electric fields at least as high as $15,000\text{ V/cm}$. The power dissipated across a weir can be as high as $3\text{--}7\text{ W/m}$ without the formation of bubbles.
20 In contrast frits formed in conventional columns have at the best been reported to form bubbles at power dissipations above 0.6 W/m , and electric fields in the range of $150\text{--}600\text{ V/cm}$ are the best that have been reported without bubble formation.

It is possible to couple an external capillary to a chip and
25 allow the weir to be used as the trapping element for the beads packed within the external electrochromatography capillary. This can be accomplished using a low dead volume coupling, such as described by Bings et al. (N.H. Bings, C. Wang, C.D. Skinner, C.L. Colyer, P. Thibeault, D.J. Harrison, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3292-3296.) In this way the chip based
30 weir can replace the frits normally formed within external capillaries, and allow higher electric fields to be used, improving speed and separation efficiency.

- 20 -

(It is noted here that it was also possible to pack the cavity by applying a vacuum at main reservoirs 1 and 2, although this was less convenient when electrokinetic flow was used for sample loading and elution.)

5 For some reason the beads 12 did not pack as tightly as was desirable (as shown in Figures 2 and 3B) they were removed from the chamber 4 by simply reversing the voltages, and the packing procedure was then repeated. It is noted that once an aqueous solution was introduced to the chamber 4, the reverse-phase beads 12 tended to
10 aggregate and were more difficult to remove. However, subsequent removal was accomplished by flushing the aqueous solution out with acetonitrile, using either EOF or vacuum, or a combination of the two. Advantageously, the ability to effectively remove the beads 12 from chamber 4 allowed used chromatographic beads to be refreshed, or a more
15 applicable material to be substituted.

 Significantly, a design utilizing a hook structure 13 at the chamber entrance (Figures 1B and 3A) yielded the most favorable results in packing, enabling the chamber 4 to be packed and remain so after removal or alteration of voltages or vacuum. As seen from the figures,
20 the side channel 5 connects to the chamber 4 via a chamber mouth 4A in an asymmetric fashion, relative to the weirs 6, 7. Also, the hook structure 13 preferably obstructs direct line-of-sight entry of packing material from the side channel 5 into the chamber 4. Rather, the hook structure 13 forces packing material to enter the chamber 4 indirectly via the chamber mouth
25 4A.

 As explained earlier, during the packing step, the packing material reservoir 3 has a positive bias applied with reservoirs 1 and 2 grounded. The inventors believe that the hooked structure 13 causes electric field lines to follow a curved pathway into the cavity.
30 Consequently, as the chromatographic beads 12 follow the electric field lines into the chamber mouth 4A they appear to be "sprayed" as if from a snow blower (Figure 3A), to become uniformly packed.

- 21 -

During the packing procedure the chamber 4 filled only to the beginning of the hook structure 13 (see Figure 3B). Once filled, the beads were observed to flow down the sides and up the middle of the narrow side channel 5 (toward packing material reservoir 3) mimicking the solvent back flow generated in a closed electrophoretic system [Shaw, D. J. *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*, 3rd ed. Butterworths: London, 1980.]. In such a closed system, EOF is directed along the walls until it reaches the end of the chamber, where pressure causes the solution to reverse direction and flow back up the center of the bead introduction channel.

A key aspect of the hooked structure as shown is the asymmetric entrance into the trapping zone, which allows for better packing. A symmetric entrance means the entering beads can go to both weirs equally, which tends to lead to uneven or difficult packing. An asymmetric structure allows the beads to pack preferentially at one end of the trapping zone first and then build up in one direction from that location. The key role of the hook structure is to prevent line-of sight outflow from the trapping zone during use of the packed bed.

Chambers constructed without an asymmetry in the entrance were not observed to pack as well as asymmetric entry designs. In these cases, packing material tended to fill the corners furthest from the entrance, but no additional material would enter the chamber. The inventors believe that, due to its symmetric design, this type of chamber exhibits solvent back flow, after it has filled to a certain extent. That is, the partially filled chamber may resemble a closed or restricted system. Such an occurrence would preclude the filling of the symmetric chamber with beads and is consistent with previously observed behavior, as explained by Shaw. Such behavior may account for the ability to fill symmetric structures on some occasions but less readily on others. In contrast, an asymmetric design, with or without a hook structure 13 guarding the entrance is less likely to experience back flow directly into the narrow bead introduction channel 5.

Solid Phase Extraction (SPE) On-Chip

As explained earlier, the present invention allows applications of microfluidic analysis systems to be extended. One such extension is facilitating SPE directly on-chip. Preconcentration is a valuable tool that can be used to enhance the sensitivity of microfluidic devices. To determine the ability of a packed SPE bed constructed on a microchip to preconcentrate an analyte, the inventors concentrated a 1.0 nM solution of BODIPY reagent from 50 mM phosphate buffer. Solution conditions utilized were similar to those used for protein and peptide analysis in HPLC-CE systems. [Bushey, M. M.; Jorgenson, J. W. *Anal. Chem.* 1990, 62, 978-984. Castagnola, M.; Cassiano, L.; Rabino, R.; Rossetti, D. V. J. *Chromatogr.* 1991, 572, 51-58.] The BODIPY reagent, when diluted in aqueous buffer, exhibits a high affinity for ODS material and is an excellent fluorophore. The preconcentration and elution of the BODIPY reagent was carried out in four steps: equilibration of the SPE bed with buffer; sample introduction; buffer flush; and elution of analyte. Following rinsing of the packed bed with phosphate buffer, a solution of 1.0 nM BODIPY was placed in main reservoir 1, and +200 V was applied for 2 minutes, with main reservoir 2 grounded. The EOF (0.2 mm/sec, 1.2×10^{-9} L/sec) flowed towards reservoir 2, carrying the BODIPY onto the SPE bed during the loading step. As shown in Figure 4A, fluorescence of the absorbed BODIPY occurred initially at the first few layers of beads 12 only (near the top of the Figure). Figure 4B shows the SPE bed after 1.5 minutes, with a total of 1.4×10^{-16} moles of BODIPY reagent loaded on the bed (assuming complete capture of the dye). No sample breakthrough was observed with BODIPY, due to its high affinity for the ODS material. In fact, visual observation indicated that after concentrating 1.0 nM BODIPY solution for two minutes only 5% of the physical volume of the SPE bed was utilized suggesting that the capacity of the 330 pL bed was about 2.8×10^{-15} moles of analyte. A buffer wash step was used after loading to wash sample remaining

- 23 -

within the channel 11 onto the bed (in chamber 4). The solutions in reservoirs 1 and 2 were then replaced with acetonitrile, and the dye was eluted with solvent moving in the same direction as the initial loading step (or by reversal of the potential gradient during the elution step, it could be directed back towards the original sample reservoir). Both procedures work well, but the latter was more convenient for our testing. Figure 5 shows graphically the 3-step preconcentration experiment for a 1.0 nM BODIPY sample following bed equilibration. The 90 second loading step showed an increase in signal as the fluorescent sample passed by the detector positioned as shown in Figure 1A. This was followed by a 60-second rinse step. Acetonitrile was then used to elute the BODIPY reagent off the bed in the opposite direction to which it was loaded, eliminating the need for detector repositioning. The BODIPY reagent eluted in a relatively narrow 3-second band following a 90-second preconcentration step exhibiting a many fold concentration increase compared to the original sample. The fluorescence of the BODIPY (1.0 nM) reagent was tested in both buffer and acetonitrile and did not show a significant difference in intensity for either of the solvents. The preconcentration factor (P.F.) can be estimated using equation (1):

$$P.F. = \frac{V_i}{V_f} = \frac{t_{pre} \cdot f_{buff}}{t_{elute} \cdot f_{elute}} \quad (1)$$

where V_i is the volume of buffer containing analyte and V_f is the volume of acetonitrile containing analyte. The volume V_i is the product of the preconcentration time (t_{pre} , sec.) and the electroosmotic flow of the sample being concentrated (f_{buff} , L/sec.) while V_f is the product of width of the eluted analyte peak (t_{elute} , sec.) and the flow rate of the eluting solvent (f_{elute} , L/sec). For this case, the analyte was preconcentrated by a factor of at least 100 times. After sufficient concentration the BODIPY is easily observed visually on the SPE bed.

Different sample loading times were utilized to increase the

amount of preconcentration. In the experiments, preconcentration times ranging from 120 - 532 seconds were studied yielding preconcentration factors of 80 - 500. Peak area (rsd 3-11%) plotted versus preconcentration time yielded a linear relationship ($r^2 = 0.9993$) over the studied conditions.

5 Capillary Electrochromatography (CEC) On-Chip

As explained earlier, another application facilitated by the present invention is on-chip capillary electrochromatography (CEC). Reversed phase mode CEC was performed on a chamber 4 packed with octadecyl silane beads 12 equilibrated with buffer. Due to the lack of an injector within the chip design, the samples were loaded onto the front of the chromatographic bed in 50 mM ammonium acetate buffer, pH 8.5 (see "Solutions and Reagents," above). Both compounds were totally retained under these conditions, as indicated by a lack of analyte signal in the loading and flush steps. The loading step functioned to both introduce the sample and preconcentrate the retained analytes at the front of the bed [Swartz, M. E.; Merion, M.; *J. Chromatogr.*, 1993, 632, 209-213.] Figure 6 shows the three steps involved in the CEC separation of BODIPY and fluorescein with a mobile phase composition of 30% acetonitrile/ 70% aqueous 50 mM ammonium acetate. Once the mixed mobile phase reaches the bed, both compounds begin to undergo chromatography and are eluted from the bed. The compounds are completely eluted and separated in less than 20 sec on less than 200 μm of chromatographic bed, yielding a plate height of 2 μm ($N = 100$ plates or 500 000 plates/m) for the fluorescein peak. Under these conditions, the fluorescein is eluted prior to the BODIPY reagent. Peaks were identified by comparing retention times of the standards with those of the mixture. At pH 8.5 fluorescein possesses a net (-2) charge while BODIPY is neutral. In a normal CZE separation the electrophoretic mobility of fluorescein would oppose the EOF, causing the BODIPY to elute prior to fluorescein. In this case the elution order of the two components is reversed, indicating an interaction between the analytes and the stationary phase. The BODIPY being more

- 25 -

hydrophobic has a higher affinity for the chromatographic material than does fluorescein causing the BODIPY to be retained more and eluted later.

Finally, Figures 7A-7D shows the CEC separation of BODIPY and fluorescein utilizing mobile phases with different concentrations of acetonitrile. It was observed that the increased acetonitrile concentration lowers the polarity of the mobile phase, decreasing the amount of time required for the BODIPY to elute. The elution time for fluorescein does not change, indicating little to no chromatographic retention except at low % acetonitrile. Decreasing the acetonitrile concentration provides baseline resolution, but leads to more extensive band broadening.

Our present results are comparable to that reported for open tubular CEC on a chip [Jacobson, S. C., Hergenröder, R., Koutny, L. B., Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* 1994, 66, 2369-2373. Kutter, J. P.; Jacobson, S. C.; Matsubara, N.; Ramsey, J. M. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3291-3297. He, B., Tait, N., Regnier, F. *Anal. Chem.* 1998, 70, 3790-3797].

Immunoassay Using Bead-based Reagents

Immunoassay on beads, or immunosorbent assays involves placing either an antibody or antigen on the surface of the bead. As a solution containing an antigen passes over the beads, the antigen specifically binds the antibody. In this way the specificity of the antigen for the antibody is utilized to separate it from other species in solution. Later the solution conditions are changed so that the antibody or antigen is eluted from the beads and is detected as either complex or the free antibody. The development of immunosorbent assays on chip is attractive because of the small amounts of reagents that are consumed. In addition microchips offer very fast analysis times compared to conventional methods performed in micro titer plates or in syringes packed with immuno-beads. Immunosorbent assays on-chip also provide lower concentration detection limits than solution phase immunoassays on-chip, making the development of bead based immunoassay on-chip important.

- 26 -

Beads that have specific enzymes linked to them are packed into the chamber created by the two weirs. The use of beads is preferential because of the increased surface area of the beads as opposed surface area of the channel walls. The higher surface area leads to a greater capacity and more efficient trapping of the analyte. The weirs form a well-defined chamber for the immunoassay beads to pack. The inventors have demonstrated bead-based immunoassay on chip for the enzyme theophylline. In the experiment magnetic beads coated with protein A are packed within the chamber of the chip. Later the antibody (antitheophylline) is flowed across the bed in a 1 mM tricine buffer pH 8.0. When the antitheophylline flows through the packed bed the antibody binds to the protein A. The antitheophylline was passed over the bed for several minute to ensure that the bed is saturated with antibody. A buffer washing step was then utilized to remove the remaining unbound antibody from the chamber and channels. The bed was then saturated with fluorescently labelled theophylline (diluted from a kit) by flowing it through the bed where it binds to the antitheophylline. The point at which the bed was saturated was determined by monitoring fluorescence below the bed and determining the point where the breakthrough curve (Figure 1) plateaus. Following breakthrough the theophylline solution is washed from the device using a buffer flush step. A chaotropic agent is then added to elute the theophylline from the bed as either free protein or theophylline/antibody complex. Chaotropic agents can be of various types, however in this example a mixture of 90% acetone/ 10 % tricine buffer was used. Once the chaotropic agent reaches the packed bed the theophylline is eluted in a relatively narrow band (Figure 2).

Although normally under these circumstances a competitive assay would be performed the direct assay demonstrates the ability of the chamber formed by the weirs to act as an immunoassay bed.

30 Enzyme Reactor Beds

There have been several methods developed for

immobilizing enzymes onto solid supports like beads. Once immobilized the enzyme beads can be packed into beds to perform chemical reactions on solutions as they are flowed through them. Normally a solution containing a substrate is passed through the bed. When the substrate
5 comes in contact with the enzyme the enzyme reacts with the substrate to yield a product. The product resulting from the reaction of the immobilized enzyme and substrate can be later used as a method of detection or in other synthetic processes. This example illustrates the use of the immobilized enzyme horse radish peroxidase(HRP) and xanthine
10 oxidase(XO) on porous silica beads (5 μ m diameter). These results show that enzymes, once immobilized onto beads, can be trapped/packed into the weir device, where they are still active and can be used as an enzyme reactor bed.

XOD and HRP were immobilized onto Nucleosil 1000-5 silica
15 beads (Machrey-Nagel, Germany) that had been silanized with 3-aminopropyltriethoxysilane, by crosslinking with glutaraldehyde (Sigma). The immobilization of enzymes on glass beads has been described previously and is known by practitioners of the art. All studies were performed using 50 mM boric acid adjusted with 1 M NaOH to pH 9.

20 The immobilization of HRP and XOD was performed to demonstrate two principals. First was the ability to pack the enzyme immobilized beads within the weir device and then second was to demonstrate that the enzyme was still active and could be utilized to catalyze reactions once packed. To show each of these principals a
25 chemiluminescent reaction was performed using the weir device.

The ability to pack immobilized enzymes allows different methods of detection to be used for certain analytes. For example the luminol chemiluminescence (CL) reaction can be used for very sensitive determinations when only small amounts of analyte are available or
30 when labeling reactions are otherwise difficult to perform. CL reactions are unique in that they do not require a light source simplifying the detection scheme. The chemiluminescence reaction catalyzed by HRP is

- 28 -

shown below.

Luminol + H_2O_2 + HRP (Light (425 nm) + other products

Beads immobilized with HRP were packed into the weir device and a solution containing the reagents for the reaction passed through the bed.

- 5 The immobilized HRP was found to catalyze the chemiluminescent reaction when a solution of H_2O_2 (100 (M) and luminol (10 mM) was flowed over a bed that had been packed with beads containing immobilized HRP. Light generated from the reaction was detected downstream from the enzyme bed.

- 10 However, it was noticed that with each successive trial the light generated from the CL reaction was lower than in the previous trial Figure 1. This is probably caused by a decrease in the activity of the enzyme with each successive run. These results evidence the advantage of a method of removing the exhausted beads and replacing them with fresh ones, such as
15 discussed for the replacement of ODS beads within the weir device.

Alternative Embodiments

- While a two weir embodiment of the design according to the present invention has been described above, other embodiments are also possible. For example, it is possible to implement a single weir design to
20 form an on-chip reactor bead (i.e. not having a second weir 6 located upstream in the main channel 11). Specifically, by providing a downstream weir 7 formed across the main channel and providing pressure only in a downstream direction (i.e. from main reservoir 2 and side channel 3 to main reservoir 1), it has been observed that packing can
25 be achieved against the downstream weir 7. However, it is noted that a single weir design may result in the formation of a ragged leading edge for the packed bed that reduces separation efficiency when used for SPE or CEC. Additionally, the high back pressure associated with a long bed of small beads limited the length of the pack to about 4 – 6 mm. A high

pressure fitting for the microchip would allow high pressure pumping and allow somewhat greater lengths.

Other types of forces may also be used to create a packed bed using a single weir design. For example, it was also possible to achieve a limited
5 degree of packing (to a length of a few millimeters) using electrokinetic forces, directed only in a downstream direction (i.e. from main reservoir 2 and packing material reservoir 3, to main reservoir 1).

In addition to varying the number of weirs, it is also possible to provide more than one inlet or outlet to a chamber, as shown in
10 alternative embodiments of the present invention in Figures 8A-8C.

In Figure 8A, a chamber 4 is formed between two weirs 6, 7. Two side channels 5a, 5b are provided to serve as an inlet or outlet to the chamber 4. As shown in Figure 6, the side channels 5a, 5b may be offset relative to each other to better facilitate packing of the chamber. A second
15 side channel is added to allow the beads to be flushed out to waste at the other end of the trapping zone, or to allow the flushing agent to be delivered from an alternate reservoir. The latter design can prevent used beads from contaminating the fresh bead stream, and/or prevent sample and sample waste solutions from being directed into the trapping zone
20 during flushing.

As shown in Figure 8B the side channel in this design may have one or more optional branches 5c, to allow the side channel 5b to be flushed of beads, or to allow beads being flushed out of the trapping zone to be directed, for example, into a waste reservoir instead of into the
25 packing material reservoir 3 (not shown).

Another embodiment is shown in Figure 8C, in which a side channel weir 16 is provided near the entrance of a third side channel 5d to the chamber 4, to allow fluid flow without passage of beads. This "weired" side channel 5d may be used, for example, to release pressure build up in
30 the chamber 4 during loading of the beads, particularly when the length of the chamber 4 (as measured between the weirs 6, 7) is greater than 4-6 mm.

In all three embodiments shown in Figures 8A-8C, the side channel

- 30 -

entrance into the chamber 4 may be modified to include a hook or similar shape, as described earlier, in order to prevent direct "line-of-sight" flow from a side channel into the chamber 4, or vice versa. As explained earlier, this entrance modification serves to spray the beads into the trapping zone in order to assist packing, and to reduce the tendency of the beads to exit from the chamber 4 during later use.

Loading of beads with more than one side channel, as shown in Figures 8A-8C, is performed in a manner similar to that for a single side channel, two weir design, (as described above) except that a potential must also be applied to the additional side channels to prevent flow into those side channels when using electrokinetic loading. During removal of the beads a voltage may be applied to a second side channel (e.g. side channel 5b in Figure 8A) to drive beads out of the trapping zone or chamber 4, applying voltage potentials such as those used with the single side channel design but adjusted for the potential drop in the additional side channel. As will be appreciated, the direction of flow during the flushing step can be controlled by the polarity of the applied voltage.

When using pressure driven flow to load beads, a back pressure must be applied to the additional side channels during loading, or else the reservoirs attached to the additional side channels may be temporarily sealed. When flushing the beads from the chamber 4, a pressure may be applied to the bead supply channel 5a to flush beads out of one or more additional side channels.

When performing SPE or CEC using a multiple side channel design and electrokinetic forces, a voltage may be applied to the additional side channels to prevent leakage of sample or beads out of the trapping zone and into the side channels, substantially in the same manner as described for a single side channel in the trapping zone. When using pressure driven pumping, the side channels may have enough positive pressure applied to eliminate flow into the side channel, or else the reservoirs attached to the respective side channels can be temporarily sealed.

- 31 -

Immobilizing the packed ODS beads with polymer

After packing the chromatographic bed with beads using electrokinetic, magnetic or pressure packing techniques, a reasonable portion of the bead introduction channel was then packed with the beads using one of these packing techniques. Excess beads in the reservoir were then removed. Then about 40 ml of a monomer mixture was pipeted into the bead reservoir and delivered by pressure or electrokinetic flow along the bead introduction channel, towards the beads. During this step, a change in refractive index in a region within the bead introduction channel was used to monitor the position of the monomer solution, and flow was stopped well before the monomer reached the packed bead bed.

A typical monomer solution may be prepared as follows: to a vial that contained 800 ml of a ternary solvent mixture that contained 10 wt% H₂O, 40 wt% 1,4-butanediol and 50 wt% 1-propanol, 200 ml of a mixture of 2,2'-azobisisobutyronitrile (AIBN, 2 wt%) and ethylene dimethacrylate (EDMA) was added. (C. Peters et al, Anal. Chem. 1997, 69, 3646-3649.) This monomer solution was then purged with N₂ for 15 min to remove dissolved oxygen. Other polymerizable solution of monomer may also be used.

The device was then kept in an oven at 60 °C for 24 - 48 hr. The device was taken out from the oven and cooled down to room temperature, with all reservoirs covered to prevent evaporation. Alternatively, photo-initiated polymerization with AIBN or other initiator may be used to polymerize the monomer solution, without a need for extended heating of the device. Following polymerization the device was rinsed with acetonitrile then with buffer. Mobile phase compositions of up to 100% acetonitrile could be used in such devices without destabilizing the bead bed.

Dimension Guidelines

While the theoretical limits of various dimensions of a microfluidic device designed according to the present invention are not

- 32 -

known, the inventors have adopted some general guidelines for practical purposes, which are discussed below.

It is thought that the length of the trapping zone may range anywhere from about 10 μm up to about 200 μm (using a coiled or
5 serpentine path if necessary to allow for incorporation of such a length within the confines of a single device wafer). The trapping zone length required will be dependent upon the application and will also be limited by the forces which may be applied to achieve packing and unpacking. For example, on-chip CEC would require relatively long trapping zones, with a
10 preferred upper limit of about 5 μm .

As to the depth of the trapping zone, sample and waste channels, a practical range is estimated to be about 400 μm to 0.25 μm . More preferably, the upper limit should be about 100 μm and the lower limit should be about 10 % larger than the particle depth at a minimum.

15 Also, in order to reduce the likelihood of clogging, the bead delivery and bead waste channels (side channels 5, 5a-5d) preferably should be at least about 3 times deeper and three times wider than the bead diameter.

The maximum dimensions of the side channels 5, 5a-5d are also dependant upon the relative flow resistances required (i.e. the flow
20 resistance of the side channel versus the main channel and the weirs, so as to minimize side channel backflow during use). Generally speaking, the flow resistance of the side channels should be higher than the flow resistance of weirs to minimize the backflow problem.

The accompanying tables provide information on the calculated
25 effect of channel and weir dimensions on the volumetric flow rates out of the trapping zone, as a function of flow channel depth, weir depth and side channel length using pressure driven flow.

In the tables below, what is called channel W is element 1 in Figure 1A; what is called channel C is called element 5 in Fig 1A; and what is
30 called channel C' is element 3 in Fig 1A

- 33 -

Correlation to Fig 1A		Width	Length
	<u>20 μm Deep</u>		
Element 1	Channel W	600	6,500
	Weir	280	variable
Element 5	Channel C	50	variable
Element 3	Channel C'	600	3,500
	<u>10 μm Deep</u>		
Element 1	Channel W	580	6,500
	Weir	280	variable

The volumetric flow rates were estimated using the Navier-Stokes equation for a rectangular channel cross section and Perry's tabulated values of the effect of channel shape. The flow resistance of a channel with half width a and half depth b is given by equation 2:

$$\Delta P/U = hL/abN \quad (2)$$

where ΔP is the pressure drop along a channel segment of length L , U is the average linear flow velocity, h is the viscosity, and N is a form factor dependent upon the cross sectional ratio b/a ($b < a$). The factor N may be estimated from solutions to the Navier-Stokes equation for pressure driven, parabolic flow, and was tabulated by Perry in Chemical Engineer's Handbook, (3rd edition, 1950) pp 387. The goal in device design is to make the resistance of the side channel, C in the Tables, higher than the resistance of the weir and the following flow channel W, so that flow across the weir is favoured. When flow elements are in series the fluid resistance given by the right hand side of equation 1 for each segment can

- be added in the manner that the resistance of series electrical impedances can be added. When fluid elements are in parallel the inverse of their fluid resistance can be added to obtain the inverse of the total impedance, as is done for parallel electrical resistances. The volumetric flow rate, Q , through a channel or a combination of channels is then given by equation 3.

$$Q = ab\Delta P/R_f \quad (3)$$

- Where R_f is the resistance to fluid flow defined by the right hand side of equation 1, combined together for all channel segments as discussed above.
- 10 The ratio, r , of volumetric flow rate across the weir, Q_w versus into the side channel, Q_C , $r = Q_w/Q_C$, should be large to ensure the percent of solution flowing across the weir, $\%Q_w = 1/(1+r)$, is high. This can be accomplished by using a long narrow side channel compared to a wide main channel, by increasing the depth of the weir relative to the depth of
- 15 the other channels, by decreasing the depth of the side channel relative to the main channel, etc, as indicated by several calculations presented in the Tables.

Table: Volumetric Flow Ratios for 10 and 20 μ m Deep Designs

Channel depth	Channel C Length	Weir Depth	Weir Length	Volumetric ratio r	$\% Q_w$
20 μ m	15,000	3	20	12.58	92.6
	25,000			20.85	95.4
	15,000		10	18.75	94.9
20 μ m	15,000	1	20	0.687	41.1
	25,000			1.16	53.6
	15,000		10	1.37	57.8

- 35 -

10 μm	15,000	3	40	38.9	97.5
	25,000			63.7	98.5
	15,000		30	41.7	97.7
10 μm	15,000	1	40	4.14	80.5
	25,000			6.87	87.3
	15,000		30	5.83	84.3

Table: Fixed Device Dimensions for Calculations with a Given Etch Depth

	Width	Length
<u>20 μm Deep</u>		
Channel W	600	6,500
Weir	280	variable
Channel C	50	variable
Channel C'	600	3,500
<u>10 μm Deep</u>		
Channel W	580	6,500
Weir	280	variable
Channel C	30	variable
Channel C'	580	3,500

Integrated Analytical Procedures

It will be appreciated that the various features of the present invention as described above may be utilized in a more complex

- 36 -

Figure 9 shows a multiple weir and multiple side channel design, generally referred to by reference numeral 20, in which several trapping zones are integrated, each serving a different function.

As an illustrative example, in a first trapping zone 25, formed
5 between weirs 6a and 6b, beads loaded with an antibody to a specific protein are introduced via side channel 25 (and exit via side channel 26). A cell lysate or serum sample or other protein source is directed from a sample reservoir (not shown) and loaded into the chip via sample inlet 21 and entrance channel 38 (the sample is removed at sample outlet 22 and
10 an eluent inlet 23 is also provided at the entrance channel. The sample is then passed into the antibody bead bed in trapping zone 25 to isolate a specific protein, while the effluent is directed towards waste outlet 27.

A chaotropic elution agent, such as an acetonitrile, water mix, is then introduced (eluent inlet 23) to elute the protein from the column
15 and deliver it to the next trapping zone 30 (formed between weirs 6c and 6d) where it is digested by a protease enzyme immobilized on beads loaded into the zone 30 (via side channels 29, 31). The effluent at this stage would be directed towards waste outlet 32. After sufficient reaction time, a buffer is delivered (elution inlet 28, running buffer 28a, waste from bed 25) to
20 flush the protein digest from the bed and into the next trapping zone 35 (formed between weirs 6e and 6f) with effluent delivered to waste outlet 39.

The third trapping zone 35 contains a solid phase extraction material (packed and unpacked via side channels 34, 35), allowing
25 concentration of the digest peptides onto the bed in zone 35. An elution solvent, such as a methanol/aqueous mixture or acetonitrile/ aqueous mixture is then introduced (elution inlet 33, running buffer 33a) to deliver (exit channel 37, waste 39, or collection 40) a concentrated protein digest to another location on the chip for final analysis.

30 Packed Bed Chip to Electrospray Mass Spectrometry Interface

Packed bed flow channels according to the present invention

- 37 -

may be interfaced to a mass spectrometer via an electrospray coupler 41, as illustrated in Figure 10. The packed bed 4 may perform an enzyme digestion of a protein, affinity purification and pre-concentration of a specific chemical or protein, solid phase extraction concentration
5 enhancement, or capillary electrochromatographic separation, or any combination of these and other steps, prior to electrospray introduction in to a mass spectrometer. The chip to electrospray interface may be made using any method that provides a less than 100 nL dead volume, preferably less than 1 nL and most preferably less than 100 pL dead volume
10 at the coupling region. A method such as that described by Wang et al., or Karger can be used to create the interface [Bings, N.H.; Wang, C.; Skinner, C.D.; Colyer, C.L.; Thibeault, P.; Harrison, D.J. *Anal. Chem.* 71 (1999) 3292-3296. Zhang, B.; Liu, H.; Karger, B.L.; Foret, F. *Anal. Chem* 71 (1999) 3258-3264].

15 While the present invention has been described by reference to various preferred embodiments, it will be understood that obvious changes may be made and equivalents substituted without departing from the true spirit and scope of the invention which is set out in the following claims.

WE CLAIM:

1. A method of treating a sample within a microfluidic analysis system, comprising the steps of:
 - 5 a) providing a main channel having a trapping zone suitable for trapping packing material;
 - b) providing a slurry of a reagent treated packing material prepared in a solution having a predetermined composition of a solvent;
 - 10 c) inducing a flow of said packing material into said trapping zone through a flow channel connected to said trapping zone so as to load said trapping zone and form a packed bed of said packing material;
 - 15 d) flowing a sample containing analytes through said packed bed, said reagent treating the sample, whereby the sample leaving the trapping zone has an altered analyte composition.
2. The method claimed in claim 1, further comprising the step of:
 - 20 e) adjusting the composition of the solvent, so as to affect the aggregation of said packing material and the stabilization of the packed bed.
3. The method claimed in claim 1 or 2, wherein, step b) comprises providing packing material comprising porous beads.
4. The method claimed in claim 3, wherein said porous beads are selected to have a diameter in the range from about 0.7 to about 10.0 μm .
- 25 5. The method claimed in claim 3, wherein said porous beads are selected to have a diameter in the range from about 1.5 to about 4.0 μm .

- 39 -

acetonitrile, and step e) comprises adjusting the concentration level to less than about 50% to stabilize the packed bed.

7. The method claimed in claim 4 or 5, wherein said solvent is acetonitrile, and step e) comprises adjusting the concentration level to less than about 30% to stabilize the packed bed.

8. The method claimed in claim 6 or 7, further including the steps of adjusting the concentration level to above 50% to destabilize the packed bed, and reversing the flow in step c) so as to unload said trapping zone.

9. The method claimed in claim 8, further including the step of repeating step c) so as to reload said trapping zone, and readjusting the concentration level to restabilize the packed bed.

10. The method claimed in claim 1, further comprising the steps of:

before step c), adding a neutral surfactant to said packing material so as to inhibit aggregation; and after step c), removing the neutral surfactant to promote aggregation.

11. The method claimed in claim 1, further comprising the steps of:

after step c) introducing a polymerizable agent into the flow channel and polymerizing said agent, so as to stabilize the packed bed.

12. The method claimed in claim 1, wherein step d) comprises applying a fluid force to induce the flow of said packing material.

13. The method claimed in claim 1, wherein said packing material

- 40 -

comprises at least some electrically charged particles and step d) comprises applying a voltage potential to induce the flow of said packing material.

14. The method claimed in claim 1, wherein said packing material comprises at least some particles susceptible to a magnetic field and step d)
5 comprises applying a magnetic field to induce the flow of said packing material.

15. The method claimed in any one of claims 1-14, including the step of providing a hook structure at the connection point between said flow channel and said trapping zone, so as to prevent direct line-of-sight
10 entry of said packing material, thereby to promote even packing.

16. A method of trapping bead based reagents within a microfluidic analysis system, comprising the steps of:

- a) providing a main channel having a trapping zone suitable for trapping bead based packing material;
- 15 b) providing a slurry of a reagent treated beads prepared in a solution having a predetermined composition of a solvent;
- c) inducing a flow of said beads into said trapping zone through a flow channel connected to said trapping zone so as to load said trapping zone and form a packed bed of
20 said beads; and
- d) adjusting the composition of the solvent, so as to affect the aggregation of said packing material and the stabilization of the packed bed.

25 17. A microfluidic analysis system, comprising:

- a) a substantially planar substrate having an upper surface;
- b) at least one main channel formed into said upper surface,

- 41 -

said main channel having first and second ends and a defined direction of flow in use;

c) a cover plate arranged over said planar substrate, said cover plate closing off said channel from above; and

5 d) a first weir formed across said main channel and between said first and second ends of said channel, said first weir providing at least one flow gap to allow, in use, at least some fluid to flow past said first weir while trapping packing material having constituent particles that are
10 generally larger than said flow gap.

18. The microfluidic analysis system claimed in claim 17, further comprising at least one side channel formed into the upper surface of said planar substrate, said side channel being connected at a first end to said main channel at a location upstream from said first weir, and at a second
15 end to a reservoir, said side channel providing a higher flow resistance than said main channel.

19. The microfluidic analysis system claimed in claim 18, further comprising a second weir located upstream from said connected first end of said side channel, said first and second weirs forming a chamber
20 therebetween, said second weir providing at least one flow gap to allow, in use, at least some fluid to flow past said second weir while trapping said packing material within said chamber.

20. The microfluidic analysis system claimed in claim 19, wherein, each side channel connection to said main channel is provided with a
25 hook structure curved to one side whereby, in use, packing material is sprayed into said chamber to facilitate even packing.

21. The microfluidic analysis system claimed in claim 20, wherein, said hook structure at least partially obstructs direct line-of-sight entry of

- 42 -

packing material from said side channel into said chamber and forms a chamber mouth to one side of said hook structure.

22. The microfluidic analysis system claimed in any one of claims 17-19, wherein, said flow gaps comprise a generally uniform gap between
5 said cover plate and the top of said weirs.

23. The microfluidic analysis system claimed in any one of claims 17-19, wherein, said flow gaps comprise a plurality of substantially vertical gaps in said weirs.

24. The microfluidic analysis system claimed in any previous
10 claim, wherein, said system is formed entirely on a single microfluidic chip.

25. A method of creating a packed reactor bed in the microfluidic analysis system claimed in claim 18, said method comprising, providing a non-conductive substrate and effecting an electrokinetic flow by applying a
15 relatively high voltage at said second end of said main channel and at said reservoir, said reservoir containing packing material, and providing a relatively low voltage at said first end of said main channel, so that packing material flows from said reservoir into said main channel and is trapped against said first weir.

20 26. The method as claimed in claim 25, wherein, packing material is removed from said main channel by providing a relatively high voltage at said first and second ends of said main channel while providing a relatively low voltage at said reservoir.

27. A method of creating a packed reactor bed in the microfluidic
25 analysis system claimed in claim 18, said method comprising, effecting a pressure driven flow by providing a relatively high pressure at said second

end of said main channel and at said reservoir, said reservoir containing packing material, and providing a relatively low pressure at said first end of said main channel, so that packing material flows from said reservoir into said main channel and is trapped against said first weir.

5 28. The method as claimed in claim 27, wherein, packing material is removed from the said main channel by providing relatively high pressure at said first and second ends of said main channel while providing relatively low pressure at said reservoir.

29. A method of packing the chamber in the microfluidic analysis
10 system claimed in claim 3, said method comprising, providing a non-conductive substrate and effecting an electrokinetic flow by applying a relatively high voltage at said reservoir, said reservoir containing packing material, and providing relatively low voltages at said first and second ends of said main channel, so that packing material flows from said
15 reservoir into said chamber and is trapped by said first and second weirs.

30. The method as claimed in claim 29, wherein, packing material is removed from the chamber by reversing said electrokinetic flow.

31. A method of packing the chamber in the microfluidic analysis
system claimed in claim 3, said method comprising, effecting a pressure
20 driven flow by providing a relatively high pressure at said reservoir, said reservoir containing packing material, and providing relatively low pressure at said first and second main reservoirs, whereby, packing material flows from said packing material reservoir into said chamber and is trapped by said first and second weirs.

25 32. The method as claimed in claim 31, wherein, packing material may be removed from the chamber by reversing said pressure driven flow.

- 44 -

33. A method of packing the chamber in the microfluidic analysis system claimed in claim 32, said method comprising, providing magnetically charged packing material, and effecting a magnetically driven flow by providing a magnetically attractive force in the chamber, whereby,
5 the packing material enters the chamber and is trapped by said first and second weirs.

34. The method as claimed in claim 34, wherein, packing material may be removed from the chamber by reversing said magnetic force in said chamber.

10 35. The method claimed in any one of claims 25-34, wherein, said packing material comprises porous beads.

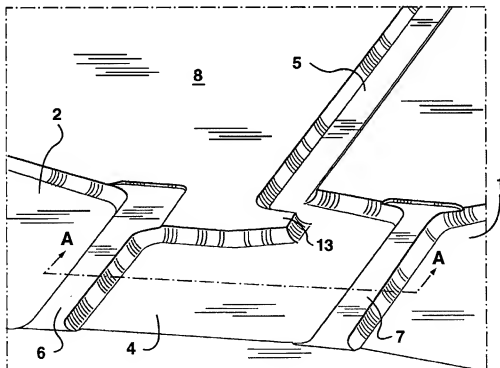
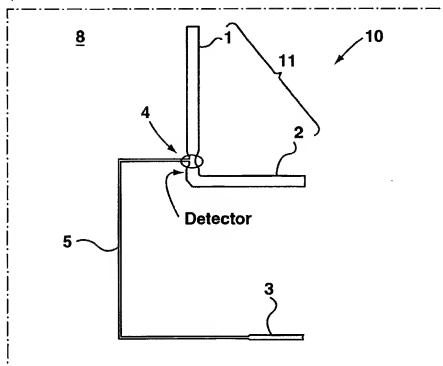
36. The method claimed in claim 35, wherein, said beads are generally spheroid.

37. The method claimed in claim 36, wherein, said beads are
15 initially suspended in a buffer solution.

38. The method claimed in claim 5, wherein, said buffer solution is an organic solvent miscible with water.

39. The method claimed in claim 38, wherein, said organic solvent is acetonitrile with a concentration level of up to 50%.

1 / 14

FIG. 1A**FIG. 1B**

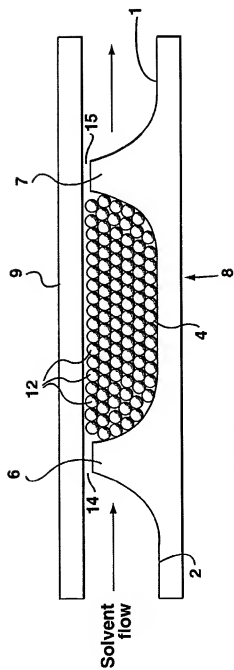
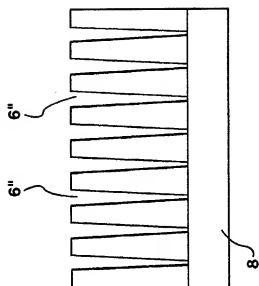
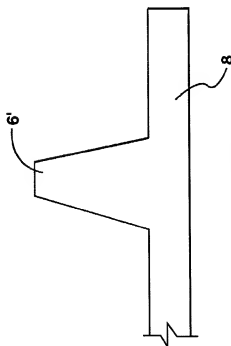
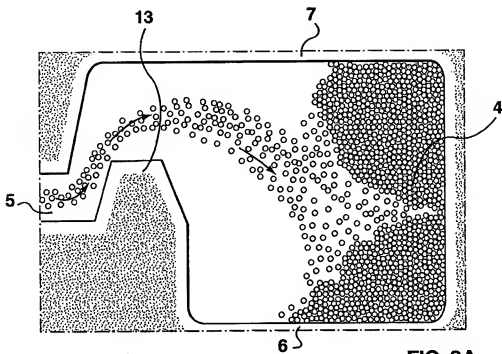
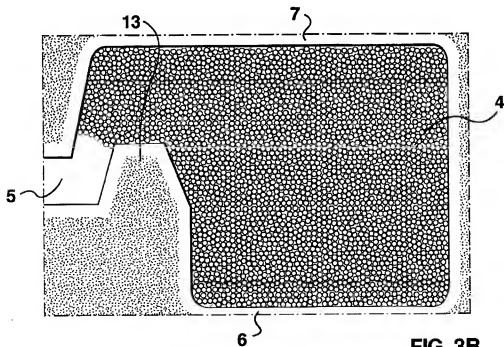


FIG. 2A

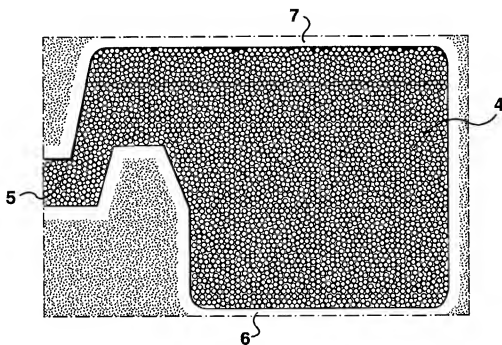
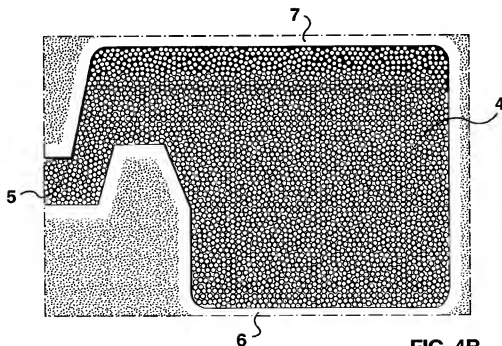
3 / 14

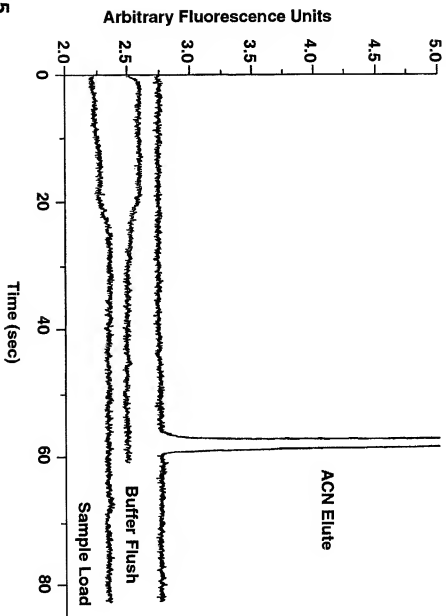
**FIG. 2C****FIG. 2B**

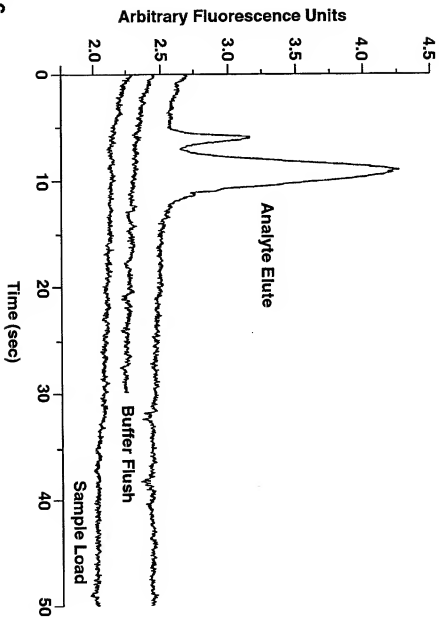
4 / 14

**FIG. 3A****FIG. 3B**

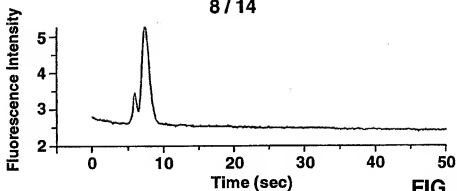
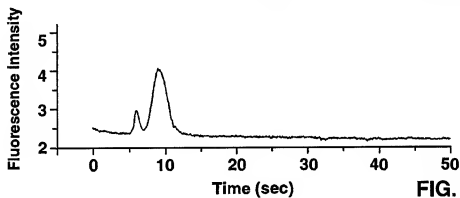
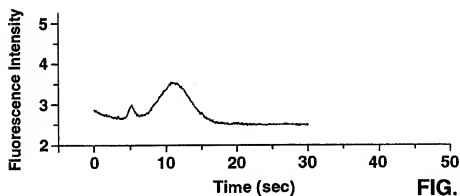
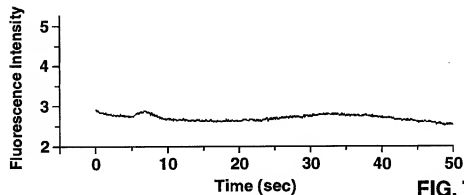
5 / 14

**FIG. 4A****FIG. 4B**

**FIG. 5**

**FIG. 6**

8 / 14

**FIG. 7A****FIG. 7B****FIG. 7C****FIG. 7D**

9 / 14

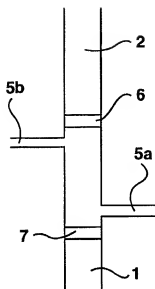


FIG. 8A

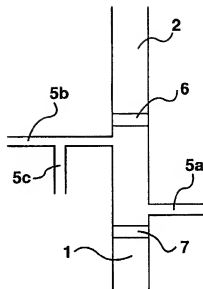


FIG. 8B

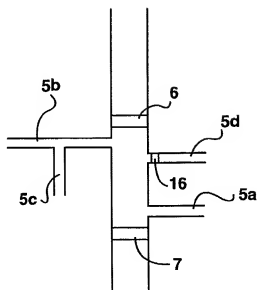
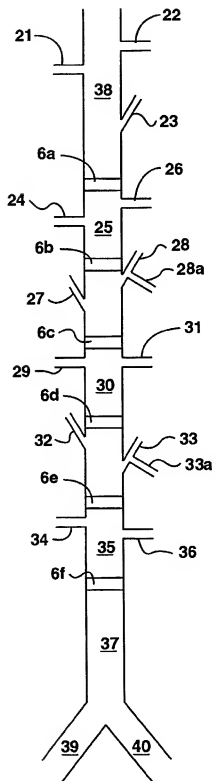
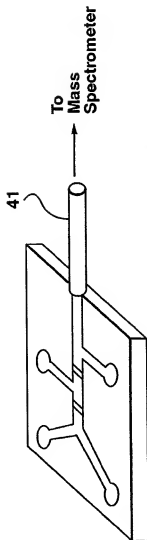


FIG. 8C

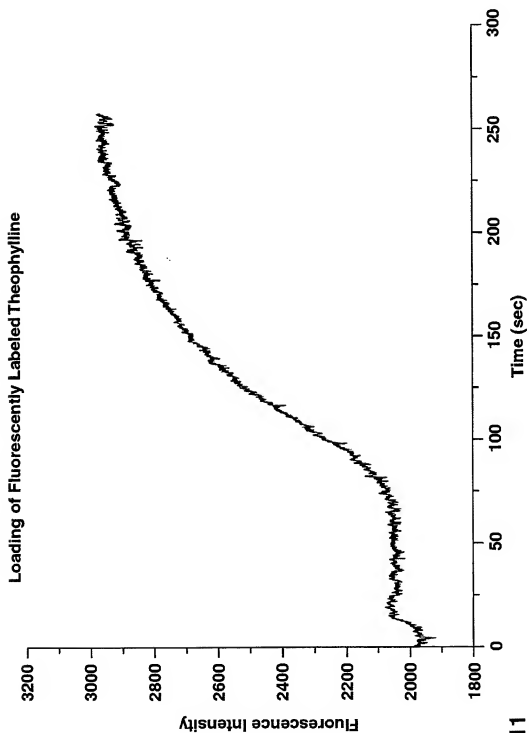
10 / 14

**FIG. 9**

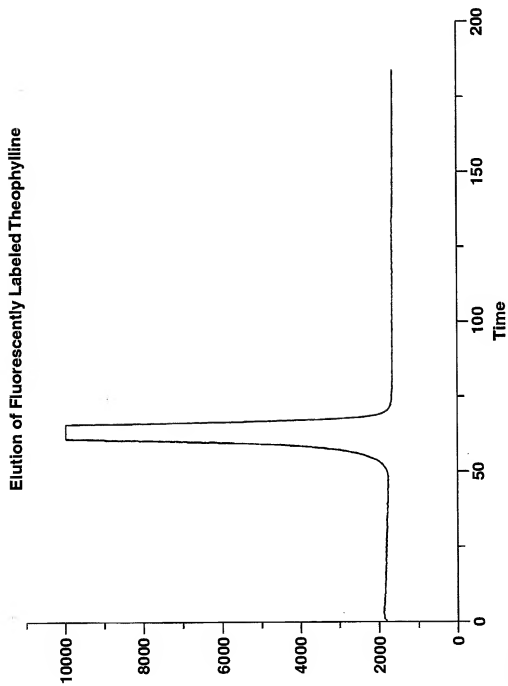
11 / 14

FIG. 10

12 / 14

**FIG. 11**

13 / 14

**FIG. 12**

14 / 14

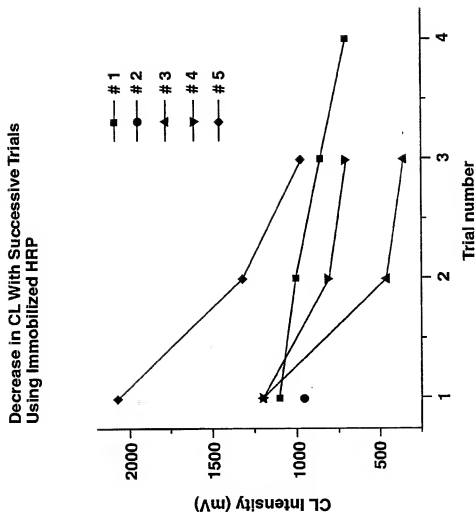


FIG. 13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. No.

PCT/CA 00/01421

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N27/447 G01N1/40 G01N30/56

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 40174 A (ACLARA BIOSCIENCES INC) 12 August 1999 (1999-08-12) page 4, line 5 -page 5, line 33 page 8, line 17-22 page 24, line 38-41	1, 12, 13
A	---	17
Y	US 5 453 163 A (YAN CHAO) 26 September 1995 (1995-09-26) cited in the application column 3, line 2 -column 5, line 23; figure 1	1, 12, 13
A	---	4, 5, 16
	--- --	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 2001

Date of mailing of the international search report

05/04/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nt,
Fax: (+31-70) 340-2016

Authorized officer

Brison, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/CA 00/01421

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WRIGHT P B ET AL: "BEHAVIOR AND USE OF NONAQUEOUS MEDIA WITHOUT SUPPORTING ELECTROLYTE IN CAPILLARY ELECTROPHORESIS AND CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY" ANALYTICAL CHEMISTRY, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS, vol. 69, no. 16, 15 August 1997 (1997-08-15), pages 3251-3259, XP000699506 ISSN: 0003-2700 cited in the application abstract page 3253, right-hand column ---	1,7
A	EP 0 459 241 A (MILLIPORE CORP) 4 December 1991 (1991-12-04) column 2, line 26 -column 3, line 41 column 5, line 36 -column 9, line 32 ---	1
A	WO 96 04547 A (LOCKHEED MARTIN ENERGY SYS INC ; RAMSEY J MICHAEL (US)) 15 February 1996 (1996-02-15) page 8, line 3 -page 11, line 8 page 24, line 8-33 ---	1,17
X,P	CHIEM N ET AL: "Room temperature bonding of micromachined glass devices for capillary electrophoresis" SENSORS AND ACTUATORS B, CH, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, vol. 63, no. 3, May 2000 (2000-05), pages 147-152, XP004198333 ISSN: 0925-4005 the whole document ---	17
A,P	C. ERICSON ET AL.: ANALYTICAL CHEMISTRY., vol. 72, no. 1, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 81-87, XP002163649 AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. COLUMBUS., US ISSN: 0003-2700 cited in the application page 81 ---	1,16
A	US 5 908 552 A (ZIMMERMANN HANS-PETER ET AL) 1 June 1999 (1999-06-01) column 1, line 44-58; figure 1 column 4, line 16-33 ---	1,16

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.

PCT/CA 00/01421

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SEIFAR R M ET AL: "Capillary electrochromatography with 1.8-µm ODS-modified porous silica particles" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A,NL,ELSEVIER SCIENCE, vol. 808, no. 1-2, 29 May 1998 (1998-05-29), pages 71-77, XP004122660 ISSN: 0021-9673 page 72 -page 73	1
A	CHIEM N H ET AL: "MICROCHIP SYSTEMS FOR IMMUNOASSAY: AN INTEGRATED IMMUNOREACTOR WITH ELECTROPHORETIC SEPARATION FOR SERUM THEOPHYLLINE DETERMINATION" CLINICAL CHEMISTRY,AMERICAN ASSOCIATION FOR CLINICAL CHEMISTRY, WINSTON,US, vol. 44, no. 3, 1998, pages 591-598, XP000937658 ISSN: 0009-9147 page 591 -page 592	17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CA 00/01421

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9940174 A	12-08-1999	US 6074827 A AU 2488799 A EP 1053298 A	13-06-2000 23-08-1999 22-11-2000
US 5453163 A	26-09-1995	NONE	
EP 0459241 A	04-12-1991	DE 69104775 D DE 69104775 T JP 4231863 A US 5348658 A US 5246577 A	01-12-1994 01-06-1995 20-08-1992 20-09-1994 21-09-1993
WO 9604547 A	15-02-1996	US 6001229 A AU 701348 B AU 3150895 A CA 2196429 A CN 1168720 A, B EP 0775306 A JP 10507516 T US 6010607 A US 6010608 A US 6033546 A US 5858195 A	14-12-1999 28-01-1999 04-03-1996 15-02-1996 24-12-1997 28-05-1997 21-07-1998 04-01-2000 04-01-2000 07-03-2000 12-01-1999
US 5908552 A	01-06-1999	EP 0779512 A	18-06-1997